



Pedro Afonso Albuquerque Travanca Mendes

Licenciado em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

Desenvolvimento e Validação de um Método de Ensaio para Análise de BTEX por SPME-GC/MS em águas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutor Vítor Vale Cardoso, EPAL, SA

Co-orientador: Professor Doutor Mário Eusébio, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Susana Filipe Barreiros

Arguente: Professor Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva

Vogal: Doutor Vítor Vale Cardoso



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017

Pedro Afonso Albuquerque Travanca Mendes

Licenciado em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Desenvolvimento e Validação de um
Método de Ensaio para Análise de
BTEX por SPME-GC/MS em águas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutor Vítor Vale Cardoso, EPAL, SA
Co-orientador: Professor Doutor Mário Eusébio, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017

Desenvolvimento e Validação de um Método de Ensaio para Análise de BTEX por SPME – GC/MS em águas

Copyright © 2017 por Pedro Afonso Albuquerque Travanca Mendes, FCT/UNL e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

"Try not to become a person of success, but rather try to become a person of value."

Albert Einstein

Agradecimentos

A realização desta dissertação foi o culminar de mais uma etapa da minha ainda curta vida. Com muitos altos e baixos, mas que permitiu o desenvolvimento das características humanas e profissionais que levo comigo.

Para a finalização desta etapa, tenho alguns agradecimentos que gostaria de fazer a algumas pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para este momento.

Primeiramente agradecer à Eng.^a Maria João Benoliel pela oportunidade de realizar o estágio no Laboratório Central da EPAL, SA.

Ao Dr. Vítor Cardoso, um enorme agradecimento por todo o apoio e conhecimento transmitidos ao longo deste trabalho, não obstante os ensinamentos a nível pessoal que me inspiraram e irão guiar daqui para a frente.

Ao Professor Mário Eusébio, por incitar a procura de conhecimento e ajuda que transmitiu não só na realização deste trabalho, mas também no decurso estudos académicos.

Por facilitarem a estadia, ao Dr. Alexandre Rodrigues, Dr.^a Ana Penetra e Dr.^a Cristina Correia como pela ajuda prestada e competências passadas de outras metodologias executadas no Laboratório.

Um especial agradecimento ao António Pato, pelo auxílio e conhecimentos passados relacionado com o software e equipamento, durante todo o processo.

Agradecer aos meus colegas, Marina, Patrícia, João Rodrigues, Marta da equipa de Química Orgânica e Inês e Salomé da equipa de Química Inorgânica por contribuírem na estadia na EPAL e todo o companheirismo facultado neste percurso.

Ainda um especial obrigado à Elidiane, D.^a Júlia e Vânia Cristina por todo apoio e disponibilidade no fornecimento de material necessário à realização deste trabalho.

Este último agradecimento é parco em palavras para a quem é devido, mas quero agradecer à minha família e amigos próximos, em especial ao meu pai, aos meus avós, aos meus irmãos e à minha namorada, Luísa, por toda a compreensão, ajuda, encorajamento, aconselhamentos, apoio nos momentos difíceis, ao longo da minha vida académica e na minha formação como pessoa. Esta dissertação é dedicada a todos eles.

Resumo

A realização desta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento e validação de um método para análise de BTEX: Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, m-xileno, p-xileno e o-xileno, resultante da preocupação e exigência com a qualidade da água de consumo humano, águas superficiais e subterrâneas.

O método de ensaio foi desenvolvido com base no método analítico de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa recorrendo à técnica de microextração em fase sólida para preparação de amostra, SPME-GC/MS.

No desenvolvimento do método, houve a necessidade de identificar cada um dos compostos pelos tempos de retenção respetivos, por cromatografia gasosa, e seleccionar os iões característicos mais abundantes de cada composto, por espectrometria de massa em modo Full Scan. A otimização da técnica de preparação da amostra, SPME, bem como a validação do método de ensaio foram efetuadas usando o modo SIM do espectrómetro de massa.

A otimização da técnica SPME foi efetuada de modo a garantir uma melhor sensibilidade e seletividade através de vários parâmetros obtendo os seguintes resultados: uso da fibra PDMS/DVB, tempo e temperatura de adsorção de 4 minutos a 30°C, desadsorção de 1 minuto, agitação a 250 rpm, modo de extração headspace e sem adição de sal, e a otimização do método cromatográfico que envolveu a escolha do modo de injeção *splitless* e a otimização do tempo de *splitless* (1 min)

Com as condições anteriores otimizadas seguiu-se a validação do método, no qual se obteve coeficientes de correlação superiores a 0,995 e com a análise de resíduos e Teste de Mandel confirmou-se a linearidade. Nos estudos de repetibilidade e precisão intermédia os valores de RSD, foram inferiores a 16% e 21%, respetivamente. Globalmente, as percentagens de recuperação obtidas em diversas matrizes de água foram entre 85 a 91%. Relativamente à estimativa da incerteza expandida, foi inferior a 40% para todos os compostos.

Palavras-chave: BTEX, SPME-GC/MS, validação, otimização

Abstract

The aim of this dissertation was the development and validation of a method for analyzing BTEX: benzene, Toluene, Ethylbenzene, m-xylene, p-xylene and o-xylene, to assure the requirement with the quality of water intended for human consumption, surface water and groundwater.

The assay method was developed based on the analytical method of gas chromatography coupled to mass spectrometry using solid-phase microextraction technique as sample preparation, SPME-GC/MS.

In the development of the method there was a need to identify each of the compounds under consideration through the respective retention times using gas chromatography and selecting the most abundant characteristic ions of each compound, using mass spectrometry in Full Scan mode. The optimization of sample preparation technique, SPME, as well as the validation of the assay, were performed using the SIM mode of the mass spectrometer.

The optimization of the SPME technique was made in order to assure a better sensitivity and selectivity through different parameters and the following results were obtained: the use of fiber PDMS/DVB, time and temperature of adsorption of 4 minutes at 30° C, 1 minute of desorption time, with agitation of 250 rpm, in headspace adsorption without salting out and the optimization of the gas chromatographic method involved the choice of the splitless injection mode and the study of the splitless time (1 min).

The method validation was performed after its optimization. The linearity studies were performed using statistical methods: residue analysis and Mandel test and the calibration curves showed a correlation coefficient greater than 0,995. In the repeatability and intermediate precision studies the relative standard deviation, RSD, values were less than 16% and 21%, respectively. Overall, the global recovery percentages obtained using several matrices were between 85 to 91%. Relatively to the estimation measurements of the expanded uncertainty, were less than 40% for all compounds.

Keywords: BTEX, SPME-GC/MS, validation, optimization

Índice de Conteúdos

Capítulo 1. Introdução.....	1
1.1 Contexto e Motivação	1
1.2 Compostos em estudo.....	2
1.3 Legislação	3
Capítulo 2. EPAL	5
Capítulo 3. Método de Preparação da Amostra	7
3.1 Introdução	7
3.2 Microextração em fase sólida.....	7
3.3 Processo de funcionamento do SPME.....	8
3.4 Fundamentos teóricos.....	9
3.5 Otimização do processo de SPME	11
3.5.1 Seleção da fibra	11
3.5.2 Modos de extração	13
3.5.3 Tempo de extração	14
3.5.4 Temperatura de extração	14
3.5.5 Tempo de desadsorção	14
3.5.6 Agitação	15
3.5.7 Salting Out.....	15
Capítulo 4. Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa	17
4.1 Cromatografia Gasosa	17
4.1.1 Introdução.....	17
4.1.2 Fundamentos Teóricos	18
4.1.3 Constituição de um cromatógrafo gasoso	23
4.2 Espectrometria de Massa.....	28
4.2.1 Introdução.....	28
4.2.2 Constituição de um espectrómetro de massa.....	29
4.2.3 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa	32
Capítulo 5. Validação de Métodos de Ensaio.....	35
5.1 Introdução	35

5.2	Parâmetros de avaliação indireta.....	35
5.2.1	Seletividade/Especificidade.....	35
5.2.2	Quantificação	36
5.2.3	Precisão	40
5.3	Parâmetros de avaliação direta.....	41
5.3.1	Exatidão.....	41
Capítulo 6. Materiais e Métodos		45
6.1	Equipamento e Material	45
6.2	Reagentes	45
6.2.1	Padrões Certificados.....	45
6.2.2	Solventes	46
6.2.3	Amostras.....	46
6.3	Procedimento Experimental	46
6.3.1	Preparação das Soluções de Trabalho (Padrão).....	46
6.3.2	Condições de otimização de SPME.....	48
6.3.3	Condições do Método Cromatográfico	49
Capítulo 7. Apresentação e Discussão de Resultados.....		51
7.1	Identificação dos Compostos em Estudo.....	51
7.2	Otimização do método de preparação da amostra.....	54
7.2.1	Seleção do Tipo de Fibra.....	55
7.2.2	Modo de Extração	55
7.2.3	Tempo de Extração.....	56
7.2.4	Temperatura de Extração.....	57
7.2.5	Tempo de Desadsorção	58
7.2.6	Agitação	59
7.2.7	Salting Out.....	59
7.3	Otimização do Método Cromatográfico.....	60
7.3.1	Tempo de Split/Splitless.....	60
7.4	Validação do Método Cromatográfico	61
7.4.1	Limites Analíticos	65

7.4.2	Seleção da Matriz	66
7.4.3	Sensibilidade do Método	67
7.4.4	Precisão	68
7.4.5	Ensaio de Recuperação	69
7.4.6	Incertezas	72
Capítulo 8. Conclusões		75
Referências Bibliográficas		79
Anexo I – Legislação		I
Anexo II – Propriedades Físico-Químicas dos Compostos em Estudo		III
Anexo III – Método dos Mínimos Quadrados e Análise de Resíduos		V
Anexo IV – Teste de Mandel		XI
Anexo V – Teste de Rikilt		XIX
Anexo VI – Teste das Áreas Normalizadas		XXV
Anexo VII – Teste de Homogeneidade de Variâncias		XXIX
Anexo VIII – Limiares Analíticos (LOD e LOQ)		XXXV
Anexo IX – Estimativa das incertezas do Método		XXXVII
Anexo X – Análise de Custos		XLI

Índice de Figuras

Figura 3.1 – Design de um dispositivo de SPME.....	8
Figura 3.2 – Processo de extração da amostra por SPME-GC: A – Introdução da seringa na amostra; B – Exposição e adsorção de analitos pela fibra; C- Recolha da seringa	9
Figura 3.3 – Processo de desadsorção da amostra por SPME-GC: D – Introdução da agulha no Injetor, E – Desadsorção dos analitos, F – Recolha da seringa.....	9
Figura 3.4 – Sistema de extração de SPME: a – Raio interno do revestimento; b – Raio exterior do revestimento; D_f – Coeficiente de difusão do analito no revestimento da fibra	12
Figura 3.5 – Modos de extração em SPME: A – Extração direta; B – Headspace; C – Utilização de membrana protetora.....	13
Figura 4.1 – Separação de uma amostra através de um processo cromatográfico: a) Injeção da amostra no cromatógrafo; b) Deslocação através da coluna dos compostos; c) Primeiro pico no cromatograma; d) Último composto a sair da coluna e respetivo aparecimento do pico no cromatograma	18
Figura 4.2 – Modelo representativo de um cromatograma	19
Figura 4.3 – Representação gráfica da equação de Van Deemter	21
Figura 4.4 – Relação entre o H e a velocidade linear média para o azoto (N_2), hélio (He) e hidrogénio (H_2).....	24
Figura 4.5 – Representação de um injetor do tipo split/splitless.....	25
Figura 4.6 – Representação de uma coluna capilar	27
Figura 4.7 – Estrutura geral da fase estacionária de polisiloxano	27
Figura 4.8 – Representação esquemática de uma fonte de ionização EI.....	30
Figura 4.9 – Representação esquemática de um quadrupolo	31
Figura 4.10 – Representação esquemática de um multiplicador de eletrões: contínuo e discreto	32
Figura 4.11 – Esquema tipo de um sistema de GC/MS.....	33
Figura 7.1 – Espectro de massa do composto Benzeno	51
Figura 7.2 – Espectro de massa do composto Tolueno	52
Figura 7.3 – Mecanismo de formação do ião característico m/z 91	52
Figura 7.4 – Espectro de massa do composto Etilbenzeno	52
Figura 7.5 – Espectro de massa do composto Xileno.....	53
Figura 7.6 – Cromatograma da solução conjunta de BTEX.....	54
Figura 7.7 – Comparação entre fibras de SPME através da variação das áreas dos compostos em função do tipo de fibra	55
Figura 7.8 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função do modo de extração.....	56
Figura 7.9 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função do tempo de extração....	57

Figura 7.10 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função da temperatura de extração	57
Figura 7.11 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função do tempo de desadsorção	58
Figura 7.12 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função da agitação utilizada ...	59
Figura 7.13 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função da quantidade de sal adicionado	60
Figura 7.14 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função do Tempo Split/Splitless	61
Figura 7.15 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o Benzeno	62
Figura 7.16 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o Tolueno	62
Figura 7.17 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o Etilbenzeno.....	62
Figura 7.18 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o o-xileno	63
Figura 7.19 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o m-,p-xileno.....	63
Figura 7.20 – Representação gráfica da sensibilidade do método para cada composto	67
Figura 8.1 – Fatores possíveis para a variabilidade dos resultados obtidos	77
Figura I.1 – Valor paramétrico imposto pela legislação para o Benzeno.....	I
Figura III.1 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos para o Benzeno.....	VIII
Figura III.2 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos para o Tolueno.....	VIII
Figura III.3 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos para o Etilbenzeno.....	IX
Figura III.4 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos para o m-,p-xileno.....	X
Figura III.5 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos para o o-xileno.....	X
Figura IV.1 e IV.2 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (Benzeno).....	XII
Figura IV.3 e IV.4 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (Tolueno).....	XIII
Figura IV.5 e IV.6 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (Etilbenzeno).....	XV
Figura IV.7 e IV.8 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (m-,p-xileno).....	XVI
Figura IV.9 e IV.10 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (o-xileno).....	XVII
Figura V.1 – Representação gráfica do Teste de Rikilt para o Benzeno.....	XX

Figura V.2 – Representação gráfica do Teste de Rikilt para o Tolueno.....	XXI
Figura V.3 – Representação gráfica do Teste de Rikilt para o Etilbenzeno.....	XXII
Figura V.4 – Representação gráfica do Teste de Rikilt para o m-,p-xileno.....	XXIII
Figura V.5 – Representação gráfica do Teste de Rikilt para o o-xileno.....	XXIV
Figura VI.1 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (Benzeno).....	XXVI
Figura VI.2 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (Tolueno).....	XXVI
Figura VI.3 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (Etilbenzeno).....	XXVII
Figura VI.4 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (m-,p-xileno).....	XXVIII
Figura VI.5 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (o-xileno).....	XXVIII

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Estrutura química característica de cada um dos compostos em estudo	2
Tabela 1.2 – Limites de referência estabelecidos para os compostos em estudo	4
Tabela 3.1 – Lista de fibras disponíveis comercialmente e respetivas aplicações	12
Tabela 6.1 – Concentração das soluções padrão individuais preparadas	47
Tabela 6.2 – Concentração da solução padrão conjunta intermédia 1 e 2 preparada	47
Tabela 6.3 – Volumes e concentrações das soluções dos padrões de trabalho	48
Tabela 6.4 – Condições de SPME ótimas obtidas.....	49
Tabela 6.5 – Condições do Injetor	49
Tabela 6.6 – Condições da Coluna.....	49
Tabela 6.7 – Condições Operacionais do forno para Full Scan.	49
Tabela 6.8 – Condições Operacionais do forno para SIM	50
Tabela 6.9 – Condições da interface	50
Tabela 6.10 – Condições do detetor	50
Tabela 6.11 – Modo de pesquisa do MS	50
Tabela 6.12 – Iões de interesse escolhidos para modo SIM.....	50
Tabela 7.1 – Condições iniciais utilizadas de SPME	54
Tabela 7.2 – Resultados experimentais obtidos pelo método dos mínimos quadrados.....	64
Tabela 7.3 – Resultados obtidos pela aplicação do Teste de Mandel	64
Tabela 7.4 – Resultados obtidos de limite de deteção e quantificação pelos dois métodos.....	65
Tabela 7.5 – Limiares analíticos determinados por razão S/N para concentração vestigial	66
Tabela 7.6 – Limiares analíticos determinados por razão S/N para padrão mais baixo da gama de trabalho.....	66
Tabela 7.7 – Resultados obtidos para as análises das diferentes matrizes	67
Tabela 7.8 – Repetibilidade para os dois níveis de concentração para n=10	68
Tabela 7.9 – Precisão intermédia para os dois níveis de concentração	69
Tabela 7.10 – Percentagens de recuperação obtidas na matriz de água de consumo humano para n=6	70
Tabela 7.11 – Percentagens de recuperação obtidas na matriz de água subterrânea, Poço das Lezírias, para n=6.....	70
Tabela 7.12 – Percentagens de recuperação obtidas na matriz de água superficial, Tejo, para n=6	71
Tabela 7.13 – Percentagens de recuperação obtidas na matriz de água superficial, Rio Zêzere, para n=6	71
Tabela 7.14 – Resultados obtidos de percentagem de recuperação global para cada um dos compostos.....	71

Tabela 7.15 – Resultados obtidos para a incerteza do método pela metodologia "passo a passo"	72
Tabela 7.16 – Resultados obtidos para a incerteza do método de acordo com VAM e OGC007 (IPAC)	72
Tabela 7.17 – Resultados obtidos para a incerteza do método de acordo com ISO 11352 e Guia Nordtest	72
Tabela 7.18 – Expressão de resultados da gama de trabalho usando 1 algarismo significativo na incerteza da medição	73
Tabela 7.19 -Expressão de resultados da gama de trabalho usando 2 algarismos significativos na incerteza da medição	74
Tabela 8.1 – Resumo dos resultados obtidos da otimização de SPME e GC	75
Tabela 8.2 – Resumo dos resultados obtidos pelo método dos mínimos quadrados	76
Tabela 8.3 – Resumo dos resultados obtidos efetuados pelos vários testes estatísticos	76
Tabela II.1 – Propriedades Físico-Químicas dos compostos em estudo	III
Tabela III.1 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o Benzeno	VII
Tabela III.2 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o Tolueno	VIII
Tabela III.3 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o Etilbenzeno	IX
Tabela III.4 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o m,p-xileno	IX
Tabela III.5 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o o-xileno	X
Tabela IV.1 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (Benzeno)	XII
Tabela IV.2 – Erros quadráticos para os dois ajustes (Benzeno)	XII
Tabela IV.3 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (Tolueno)	XIII
Tabela IV. 4 – Erros quadráticos para os dois ajustes (Tolueno)	XIV
Tabela IV.5 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (Etilbenzeno)	XIV
Tabela IV.6 – Erros quadráticos para os dois ajustes (Etilbenzeno)	XV
Tabela IV.7 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (m,p-xileno)	XVI
Tabela IV.8 – Erros quadráticos para os dois ajustes (m,p-xileno)	XVI
Tabela IV.9 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (o-xileno)	XVII
Tabela IV.10 – Erros quadráticos para os dois ajustes (o-xileno)	XVIII
Tabela V.1 – Cálculo das razões para o Teste de Rikilt (Benzeno)	XX
Tabela V.2 – Cálculo das razões para o Teste de Rikilt (Tolueno)	XXI
Tabela V. 3 – Cálculo das razões para o Teste de Rikilt (Etilbenzeno)	XXII
Tabela V.4 – Cálculo das razões para o Teste de Rikilt (m,p-xileno)	XXIII
Tabela V.5 – Cálculo das razões para o Teste de Rikilt (o-xileno)	XXIV
Tabela VI.1 – Cálculo dos valores normalizados para o Benzeno	XXV
Tabela VI.2 – Cálculo dos valores normalizados para o Tolueno	XXVI
Tabela VI.3 – Cálculo dos valores normalizados para o Etilbenzeno	XXVII

Tabela VI.4 – Cálculo dos valores normalizados para o m-,p-xileno.....	XXVII
Tabela VI.5 – Cálculo dos valores normalizados para o o-xileno.....	XXVIII
Tabela VII.1 e VII.2 – Áreas obtidas para as duas gamas de concentração (Benzeno).....	XXX
Tabela VII.3 e VII.4 – Áreas obtidas para as duas gamas de concentração (Tolueno).....	XXXI
Tabela VII.5 e VII.6 – Áreas obtidas para as duas gamas de concentração (Etilbenzeno)....	XXXII
Tabela VII.7 e VII.8 – Áreas obtidas para as duas gamas de concentração (m-,p-xileno)....	XXXIII
Tabela VII.9 e VII.10 – Áreas obtidas para as duas gamas de concentração (o-xileno).....	XXXIV
Tabela VIII.1 – Resultado obtido do LOD e LOQ para a gama baixa: 0,29 (µg/L) (Benzeno e Tolueno).....	XXXV
Tabela VIII.2 – Resultado obtido do LOD e LOQ para a gama baixa: 0,11 (µg/L) (Etilbenzeno).....	XXXVI
Tabela VIII. 3 – Resultado obtido do LOD e LOQ para a gama baixa: 0,20 (µg/L) (m-,p-xileno e o-xileno).....	XXXVI
Tabela X.1 – Custos associados ao desenvolvimento do método.....	XLI

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ΔC – Variação de Concentração

ΔL – Variação do Sinal Analítico

α – Fator de separação

A_{100} – Área de Pico Correspondente ao Ponto com Melhor Correlação

A_i – Área de Pico Correspondente a uma Determinada Concentração

BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno

b – Ordenada na Origem

C_0 – Concentração Inicial de Analito na Amostra

C_{100} – Concentração Correspondente ao Ponto com Melhor Correlação

CAL – Companhia das Águas de Lisboa

CAR – Carboxen

CE – Comissão Europeia

C_f – Concentração de Analito na Fibra

C_i – Concentração Correspondente à Área A_i

CI – Ionização Química

C_M – Concentração na Fase Móvel

C_S – Concentração na Fase Estacionária

C_s – Concentração de Analito na Amostra

C_p – Concentração Experimental

C_T – Concentração Teórica

CV_m – Coeficiente de Variação do Método

D_f – Coeficiente de difusão

DVB – Divinilbenzeno

DL – Decreto-Lei

ECD - Detetor por Captura de Electrões

EI – Electroionização

EIL – Ensaios Interlaboratoriais

EPAL – Empresa Portuguesa das Águas Livres, SA

ETA – Estação de Tratamento de Água

$F_{crítico}$ – Valor Tabelado da Distribuição de Fisher

FID - Detetor de Ionização de Chama

GC – Cromatografia Gasosa

GC/MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa

HETP – Altura Equivalente de um Prato Teórico

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IPAC – Instituto Português de Acreditação
ISO – Organização Internacional de Normalização
K – Constante de Distribuição
k – Fator de Retenção
 K_{fs} – Coeficiente de Distribuição/Partição entre a fibra e a matriz da amostra
 K_{hs} - Coeficiente de Distribuição/ Partição entre a fase gasosa e a amostra
L – Comprimento da Coluna
LLE- Extração Líquido-Líquido
LOD – Limite de Detecção ($\mu\text{g/L}$)
LOQ – Limite de Quantificação ($\mu\text{g/L}$)
MM – Massa Molecular
MS – Espectrometria de Massa
m - Declive da Reta de Calibração
m/z – Razão Massa/Carga
N – Número de Pratos Teóricos
n – Quantidade de Analito Adsorvido pela fibra
NQA – Norma de Qualidade Ambientais
PA – Poliacrilato
PAH – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PEG – Polietilenoglicol
PG – Valor de Teste (Teste de Homogeneidade de Variâncias)
PDMS – Polidimetilsiloxano
PTFE – Politetrafluoretileno
r – Limite de Repetibilidade
RSD- Desvio Padrão Relativo
 R_s – Resolução
S – Sensibilidade
S/N – Razão Sinal/Ruído
SIM – Monitorização Seletiva de Iões
 S_m – Desvio Padrão do Método
SPE – Extração em Fase Sólida
SPME – Microextração em Fase Sólida
 $S_{y/x}$ – Desvio Padrão Residual da Reta de Calibração
 S_{x0} – Desvio Padrão associado ao Branco/Padrão de Menor Concentração
 t_e – Tempo de Equilíbrio
 t_M – Tempo Morto
 t_r – Tempo de Retenção

t_r' – Tempo de Retenção Ajustado
 \bar{u} – Velocidade Linear da Fase Móvel
 u_c – Incerteza Combinada
 $u_{\text{exatidão}}$ – Incerteza Associada à Exatidão
 $u_{\text{padrão}}$ – Incerteza Padrão Associada à Preparação de Padrões
 $u_{\text{precisão}}$ – Incerteza Associada à Precisão
 $u_{\text{prec int}}$ – Incerteza Associada à Precisão Intermédia
 u_{reta} – Incerteza Padrão Associada à Interpolação da Reta
 U – Incerteza expandida do método
 UE – União Europeia
 V_f – Volume de Revestimento
 V_h – Volume de *Headspace*
 $VOCs$ – Compostos Orgânico Voláteis
 V_M – Volume da Fase Móvel
 V_s – Volume de Amostra
 V_S – Volume da Fase Estacionária
 VT – Valor de Teste
 W – Largura do Pico
 WHO – Organização Mundial de Saúde
 m -xileno – *meta*-xileno
 p -xileno – *para*-xileno
 o -xileno – *orto*-xileno

Capítulo 1. Introdução

1.1 Contexto e Motivação

A água é uma das maiores comodidades que o Homem mais tem explorado que outro qualquer recurso para a sua própria sustentabilidade. Desde o consumo próprio, a urbanização, a agricultura e a industrialização, a procura por água é demasiado grande tentando acompanhar com todos os recursos disponíveis (águas subterrâneas, águas superficiais) [1]. Contudo, com a procura vem a necessidade e a preocupação de garantir uma maior qualidade da água através de tratamentos a partir de novas metodologias mais eficientes e menos dispendiosas. Apesar de no presente ser exigido um maior controlo na qualidade de água consumida, o cuidado no seu consumo já vem dos tempos primordiais com o uso de técnicas de tratamento inovadoras para a época. Originalmente, os primeiros métodos de tratamento focavam-se nas condições organoléticas da água, sendo datados a 4000 a.C descritos na literatura sânscrita e grega. A filtração através de carvão, a exposição à luz solar e o uso da fervura eram tratamentos aplicados na altura. Com o evoluir do tempo novos métodos apareciam, como em 1500 a.C, através da comunidade Egípcia com a adição de alúmen que permitia a filtração das impurezas suspensas. Porém só a nível organolético existiam tratamentos, não havendo soluções para possíveis substâncias químicas presentes nas águas. Já só no séc. XVII com a invenção do microscópio a comunidade científica ganhou uma melhor compreensão das fontes e dos efeitos dos contaminantes presentes na água de consumo, pela observação dos primeiros microrganismos. A título de exemplo, em 1855, o epidemiologista John Snow conseguiu provar que a cólera era uma doença com origem nas águas provenientes dos esgotos e Louis Pasteur, no fim do século XIX, que demonstrou pela “Teoria de Germes”, como os micróbios podem transmitir doenças através da água. De realçar que em 1914, é implementada a primeira regulamentação para a qualidade de água nos Estados Unidos, vindo a sofrer alterações com o surgimento de novos parâmetros de análise [2,3].

À medida que a população e a procura de água potável aumentam, é importante examinar a qualidade da água e identificar contaminantes que venham a surgir nas fontes de água quando frequentemente são expostas a grandes quantidades de substâncias originárias de atividades antropogénicas. Dos contaminantes possíveis de surgir nas águas estão os compostos orgânicos voláteis, VOCs, introduzidos no meio aquático, principalmente, pela indústria [4].


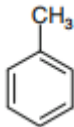
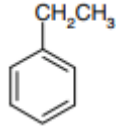
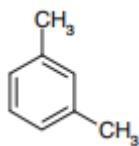
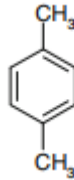
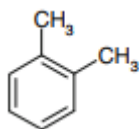
No âmbito desta tese serão estudados alguns compostos orgânicos voláteis, em detalhe no subcapítulo 1.2, através do desenvolvimento de um método de ensaio por SPME-GC/MS de acordo com as normas associadas e com vista a um maior controlo na qualidade da água, sendo assim capazes de monitorização quando antes não o eram observados.

1.2 Compostos em estudo

Segundo a diretiva da EU 2008/112/EC e a *Royal Society of Chemistry* os compostos orgânicos voláteis, VOCs, por definição, são compostos orgânicos que a 20°C possuem uma pressão de vapor igual ou superior a 0,01 kPa, mas inferior a 101,3 kPa, presentes na atmosfera como resultado da atividade humana. Estes incluem uma grande gama de compostos nos quais se inserem os hidrocarbonetos [5].

No contexto deste trabalho serão estudados o Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e os isómeros do Xileno, especificamente, 1,2-dimetilbenzeno (*orto*-xileno), 1,3-dimetilbenzeno (*meta*-xileno) e 1,4-dimetilbenzeno (*para*-xileno), compostos designados por BTEX e classificados como hidrocarbonetos aromáticos com base no anel benzénico presente na sua estrutura química, sendo observáveis na Tabela 1.1 [6].

Tabela 1.1 – Estrutura química característica de cada um dos compostos em estudo

Composto	Estrutura química
Benzeno	
Tolueno	
Etilbenzeno	
m-xileno	
p-xileno	
o-xileno	

Todos os compostos em estudo são líquidos e incolores com um odor característico, com elevada volatilidade (pressão de vapor característica a cada um dos compostos encontra-se no Anexo II), tendo como fonte o petróleo bruto, podendo ser encontrados nas águas devido aos depósitos de gás natural e das refinarias de petróleo. As principais libertações de BTEX, no meio ambiente, ocorrem através das emissões dos veículos a motor. A título de exemplo, o Tolueno é um dos compostos presentes na composição de um cigarro. A preocupação é grande com estes compostos, pois estão entre os mais produzidos no mundo com uma grande variedade de aplicações, entre os quais, produtos petrolíferos (gasolina), bens de consumo, tintas, produtos de borracha, cosméticos e produtos farmacêuticos [7, 8].

O perigo destes compostos, em particular do Benzeno que possui efeitos carcinogénicos, já levou a que existam estudos de forma a proceder à sua monitorização, contudo há a necessidade de complementar esse estudo de acordo com as normas e legislação vigentes para a qualidade da água [9 – 11].

1.3 Legislação

A necessidade de proteger o meio aquático, principalmente a água de consumo produzida a partir de águas superficiais e subterrâneas em relação ao aparecimento de substâncias perigosas à saúde humana, obrigou vários países da União Europeia a adotar medidas de monitorização e controlo da qualidade da água. Um exemplo é o DL 236/98 de 1 de agosto que define os níveis de qualidade das águas superficiais e subterrâneas destinadas à produção de água para consumo humano. Este DL não referia a obrigatoriedade de análise de BTEX em águas superficiais e subterrâneas. Posteriormente, surgiu o DL 103/2010 de 24 de setembro e, mais tarde, o DL 218/2015 de 7 de outubro que estabelece as normas de qualidade ambientais (NQA) para as substâncias prioritárias e para outros poluentes em águas superficiais. Estes DL resultam da transposição das diretivas europeias 2008/105/CE de 16 de dezembro, e 2013/39/EU de 12 de agosto, respetivamente. Nestes decretos é referida a obrigatoriedade de monitorização do Benzeno indicando uma concentração máxima admissível para águas superficiais de 50 µg/L.

Em relação aos compostos em estudo, apenas o Benzeno está incluído na legislação nacional relativa à água de consumo humano. De acordo com o decreto-lei 306/2007 de 27 de agosto que resulta da transposição da Diretiva 98/83/CE de 3 de novembro, indica que o valor paramétrico para o Benzeno é de 1 µg/L (Anexo I) e que o limite de deteção do método de ensaio realizado deve ser 25% do valor paramétrico.

Apesar de não existir legislação nacional aplicada ao Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos, há organizações altamente reconhecidas como a Organização Mundial de Saúde (WHO) e a National Health and Medical Research Council (Austrália) que apresentam diretrizes para a qualidade de água apresentando valores guias para estes, como é possível observar pela Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Limites de referência estabelecidos para os compostos em estudo [8, 12]

Composto	Valor Guia (µg/L) (WHO)	Valor Guia (µg/L) (NHMRC)	Valor Paramétrico (µg/L)
Benzeno	10	1	1
Tolueno	700	800	s/limite
Etilbenzeno	300	300	s/limite
Xilenos	500	600	s/limite

Capítulo 2. EPAL

A EPAL, atualmente Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A, é a sucessora da Companhia das Águas de Lisboa (CAL) empresa que entre 1868 e 1974 foi responsável pelo abastecimento de água à cidade de Lisboa. A partir de 1974 foi criada a EPAL que transitou de nome até se fixar no atual, em 1991, aquando da sua transformação em sociedade anónima de capitais integralmente públicos.

A empresa tem como responsabilidade a melhoria de acesso à água de consumo humano bem como, a melhoria da sua salvaguarda, proteção e gestão sustentável, no presente, agilizando o futuro. Com a missão de conceber, explorar, construir e gerir a EPAL foi crescendo de forma sustentada e atualmente é responsável pela exploração e gestão do sistema multimunicipal de abastecimento de água e do saneamento do Vale do Tejo, juntamente com Águas do Vale do Tejo, abrangendo 88 municípios correspondentes a uma área de 33% do território nacional servindo 3,8 milhões de pessoas.

O sistema de abastecimento de água integra o sistema de produção e transporte e o sistema de distribuição. Inserido no sistema de produção, o subsistema de captação compreende duas fontes superficiais localizadas na Albufeira de Castelo de Bode (Rio Zêzere) e no rio Tejo, em Valada, e cerca de 20 captações subterrâneas particularmente no rio Alviela (Nascente dos Olhos de Água) e os poços nas Lezírias, Alenquer e OTA. O mais importante nos subsistemas referidos é a Albufeira de Castelo de Bode representando cerca de 75% da capacidade total de produção da empresa. O transporte e o sistema de distribuição desenrolam-se com acesso a adutores, reservatórios, estações elevatórias, entre outros, chegando assim ao seu destino.

Com a preocupação focalizada na qualidade da água para abastecimento da população, existem dois laboratórios de ensaio, um localizado em Lisboa e outro na ETA de Vale da Pedra, que são responsáveis pela análise das águas desde a sua captação até à casa dos consumidores, no qual, são possuidores de equipamento de última geração e recursos humanos altamente qualificados permitindo a execução de ensaios obrigatórios presentes na legislação em vigor, com critérios de qualidade rigorosos viabilizando a garantia de exatidão e precisão dos resultados obtidos. Para cumprir todos os requisitos e garantir a competência dos tratamentos de água realizados, os laboratórios são acreditados pela Norma NP EN ISO/IEC 17025 sendo analisados 110 parâmetros da qualidade da água correspondendo a 198 compostos e realizados 135 métodos analíticos para ensaios em águas divididos entre áreas analíticas distintas: Microbiologia e Biologia, Química Inorgânica e Química Orgânica [13].

Capítulo 3. Método de Preparação da Amostra

3.1 Introdução

A necessidade de analisar compostos encontrados em diversas matrizes líquidas, inclui uma variada gama de áreas de interesse: farmacêutica, análises clínicas, ambiental, medicina legal, entre outras. Um meio de investigar substâncias presentes neste tipo de matrizes (água, plasma, soro, urina, etc.) é através de análise cromatográfica que requer geralmente um pré-tratamento da amostra. As razões para tal se verificar são inúmeras, destacando-se a complexidade das matrizes, onde estão inseridos os compostos; a existência de proteínas em fluidos biológicos que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a concentração das substâncias a estudar a nível vestigial nas matrizes ambientais.

O objetivo final é a obtenção de uma sub-fração da amostra inicial enriquecida com os analitos de interesse em estudo, garantindo uma maior sensibilidade do método de ensaio, de forma a se realizar uma separação cromatográfica livre de potenciais interferentes, garantindo uma maior seletividade do método e uma maior robustez e reprodutividade independente de variações da matriz da amostra, com um nível de detecção apropriado e um razoável tempo de análise.

As técnicas normalmente mais utilizadas são: extração líquido-líquido, extração em fase sólida para compostos não-voláteis e microextração em fase sólida para compostos voláteis [9,14].

3.2 Microextração em fase sólida

Relativamente recente e usada com sucesso, a microextração em fase sólida (SPME) tem sido apresentada como uma alternativa moderna aos métodos de preparação de amostras tradicionais. Surgiu em 1989 por Pawliszyn e seus colaboradores numa tentativa de melhorar as inerentes limitações das técnicas mais tradicionais, como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). Num único passo, integra a amostragem, extração e concentração da amostra, isenta de solventes orgânicos, sendo uma das principais vantagens bem como a sua fácil utilização, aplicabilidade a muitos tipos de analitos, uma diminuição substancial dos tempos de análise, uma capacidade de automatização maior referente ao passo de preparação de amostra e custos de processo mais baixos. A técnica de SPME possui a capacidade de melhorar os limites de detecção na ordem dos ppt (ng/L), tanto para compostos voláteis como semi-voláteis, comparativamente às outras técnicas [15, 16].

3.3 Processo de funcionamento do SPME

O dispositivo de microextração em fase sólida (SPME) contém uma fibra de sílica fundida de 1 cm de comprimento, revestida com um filme polimérico estando ligada a um êmbolo de aço inoxidável no qual está instalado um suporte similar a uma seringa. A fibra de sílica movimenta-se para dentro e para fora do interior da agulha com o auxílio do êmbolo, sendo que esse movimento é controlado por um pequeno parafuso que se direciona somente no eixo dos zz . A Figura 3.1, representa a estrutura de uma seringa de SPME [15, 17].

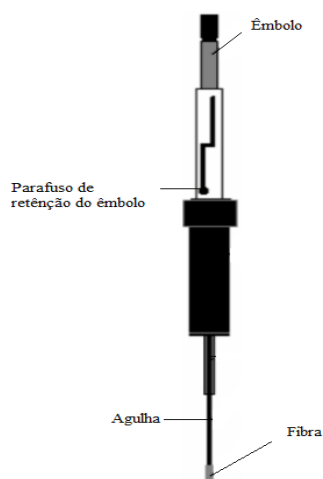


Figura 3.1 – Design de um dispositivo de SPME (Adaptado de [69])

Esta unidade realiza uma sequência de procedimentos, iniciada pelo processo de extração (representada na Figura 3.2), em que consiste no deslocamento da fibra em direção à agulha, passando a agulha através do septo que veda o frasco da amostra (A), pressiona-se o êmbolo para baixo expondo a fibra em contacto com a amostra ou com o *headspace* sobre a amostra onde ocorre a adsorção dos analitos orgânicos pelo revestimento da fibra até suceder o equilíbrio de adsorção, geralmente entre 2 a 30 minutos, de acordo com o tipo de analitos em análise (B), e de seguida é recolhida a fibra para dentro da agulha, que desta forma mantém a integridade do revestimento, e a agulha é removida do frasco que contém a amostra (C).

O segundo passo e o final, o processo de desadsorção (representado na Figura 3.3), dá-se quando a agulha é introduzida no injetor do cromatógrafo gasoso (D), expondo a fibra a altas temperaturas onde os analitos adsorvidos sofrem desadsorção térmica, e são libertados para a coluna de GC (E). Por fim, recolhe-se a fibra e retira-se a agulha do injetor (F). Para além do método analítico de GC/MS esta técnica de preparação de amostra também pode ser usada em HPLC [5, 6, 20].

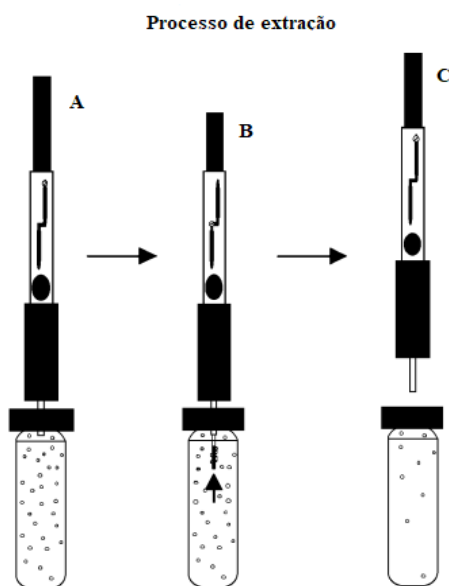


Figura 3.2 – Processo de extração da amostra por SPME-GC: A – Introdução da seringa na amostra; B – Exposição e adsorção de analitos pela fibra; C- Recolha da seringa (Adaptado [18])

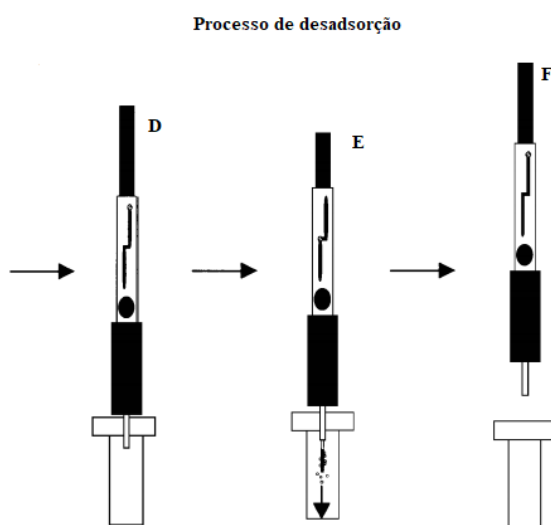


Figura 3.3 – Processo de desadsorção da amostra por SPME-GC: D – Introdução da agulha no Injetor, E – Desadsorção dos analitos, F – Recolha da seringa. (Adaptado de [18])

3.4 Fundamentos teóricos

O princípio elementar na técnica de SPME é a extração dos analitos da amostra pela fibra revestida por um filme polimérico. O processo, no caso de só se considerarem duas fases, é considerado completo quando a concentração do analito chega a um equilíbrio de distribuição entre a matriz e a fibra adsorvente. O coeficiente de distribuição ou partição, K_{fs} , dos analitos entre a matriz da amostra e a fibra adsorvente é dado pela equação 3.1.

$$K_{fs} = \frac{C_f}{C_s} \quad (\text{Equação 3.1})$$

Onde C_f é a concentração de analito na fibra adsorvente e C_s é a concentração de analito na amostra. Na prática, significa que quando é atingido o equilíbrio a quantidade extraída é constante dentro dos limites do erro experimental e é independente de aumentos adicionais do tempo de extração. As condições de equilíbrio podem ser descritas pela equação:

$$n = \frac{K_{fs}V_fC_0V_s}{K_{fs}V_f + V_s} \quad (\text{Equação 3.2})$$

Onde n é a quantidade de analito adsorvido pelo revestimento da fibra, C_0 é a concentração inicial de analito na amostra e V_f e V_s é o volume do revestimento da fibra e volume da amostra, respetivamente. A partir da Equação 3.2, quando se verifica um volume da amostra bastante superior (isto é, $V_f \ll V_s$) a quantidade de analito extraído pelo revestimento da fibra é independente do volume da amostra, referido na Equação 3.3:

$$n = K_{fs}V_fC_0 \quad (\text{Equação 3.3})$$

Na prática, não há necessidade de recolher uma amostra definida antes da análise, dado que a fibra pode ser exposta diretamente ao ar ambiente, à água, ou a um efluente (análise de campo). A quantidade de analitos extraídos tem correspondência direta com a concentração de analitos existentes inicialmente na matriz da amostra, sem ser dependente do volume da amostra [21].

Como mencionado inicialmente neste subcapítulo, as equações apresentadas são referentes a duas fases, o revestimento da fibra e a matriz da amostra. No caso de haver uma terceira fase, *headspace*, a quantidade de analito adsorvido é dado pela seguinte equação:

$$n = \frac{K_{fs}V_fC_0V_s}{K_{fs}V_f + K_{hs}V_h + V_s} \quad (\text{Equação 3.4})$$

Ou seja, soma-se ao denominador da equação 3.4 a parcela $K_{hs}V_h$, coeficiente de distribuição *headspace*/amostra e volume de *headspace*, respetivamente, que indica a capacidade de conter o analito nessa fase [16, 20, 21, 22].

3.5 Otimização do processo de SPME

São várias as aplicações que utilizam a técnica de SPME como ferramenta de investigação. Tal preponderância implica a necessidade de otimizar o processo para cada situação obtendo resultados reprodutíveis e precisos, garantindo assim o êxito no resultado final do ensaio [16].

De forma a garantir esse sucesso, vários parâmetros são estudados e otimizados consoante as propriedades intrínsecas (afinidade com a fibra, solubilidade, volatilidade entre outros) dos analitos de interesse. Os parâmetros a ser estudados e otimizados neste trabalho passam pela seleção do tipo de fibra, o modo de extração de SPME, o tempo de extração, a temperatura de extração, a temperatura de desadsorção, agitação e o uso de *salting out*.

3.5.1 Seleção da fibra

Para uma dada aplicação a escolha do revestimento da fibra a utilizar é de extrema importância de forma a garantir um maior sucesso de extração. O revestimento é escolhido tendo por base a massa molecular, a polaridade, e concentração do analito, mas também a complexidade da matriz.

Em relação à massa molecular este determina a velocidade que um analito migra entre o revestimento da fibra e a amostra, influenciando a capacidade de adsorção. Um analito com uma massa molecular pequena move-se a uma maior velocidade e por conseguinte necessita de menos tempo para atingir o equilíbrio de adsorção, enquanto que um analito de massa molecular maior conduz a uma velocidade menor resultando num maior tempo para atingir o equilíbrio de adsorção. Assim existem fibras com revestimentos de maior espessura que aumentam a sensibilidade e a seletividade. Esta variação de espessura está relacionada com o tempo de equilíbrio, t_e , e como consequência influenciam o tempo de extração. O tempo de equilíbrio é atingido quando cerca de 95% da quantidade de analitos em equilíbrio é extraído da amostra, demonstrado pela seguinte equação [16, 21, 23]:

$$t_e = t_{95\%} = \frac{(b - a)^2}{2D_f} \quad (\text{Equação 3.5})$$

A Equação 3.5 indica que o coeficiente de difusão do analito para o revestimento, D_f , e a espessura do revestimento, o termo $(b - a)$, estão diretamente correlacionados com o tempo de equilíbrio.

A Figura 3.4 é ilustrativa dos termos que surgem na Equação 3.5.

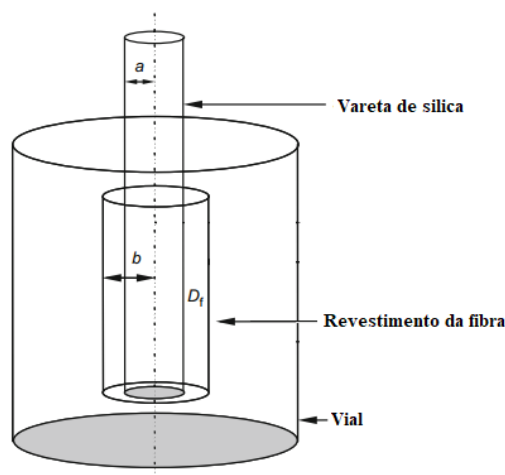


Figura 3.4 – Sistema de extração de SPME: a – Raio interno do revestimento; b – Raio exterior do revestimento; D_f – Coeficiente de difusão do analito no revestimento da fibra (Adaptado de [70])

De extrema importância na escolha do revestimento da fibra a utilizar é a polaridade do analito, a regra de “igual atrai igual” é aplicada nesta seleção, pois para compostos polares são usados revestimentos polares e para compostos apolares e semipolares o princípio utilizado é o mesmo [24].

Na Tabela 3.1 está apresentada a lista de fibras disponíveis comercialmente a ser usadas no SPME:

Tabela 3.1 – Lista de fibras disponíveis comercialmente e respectivas aplicações [25]

Tipo de revestimento	Espessura (μm)	Aplicações
PDMS	7	GC/HPLC para compostos apolares de elevado PM
PDMS	30	GC/HPLC para compostos semi-voláteis apolares
PDMS	100	GC/HPLC para voláteis
PDMS/DVB	65	GC/HPLC para compostos voláteis e aminas
PA	85	GC/HPLC para semi-voláteis polares
PEG	60	GC/HPLC para álcoois e compostos polares
CAR/PDMS	75/85	GC/HPLC para gases e compostos de baixo PM
DVB/CAR/PDMS	50/30	GC/HPLC para aromatizantes: voláteis e semi-voláteis
PDMS/DVB	60	HPLC para aminas e compostos polares

A escolha do revestimento da fibra para além da relação com os analitos de interesse em estudo tem de ter em conta a sua resistência a condições químicas (pH, sais, aditivos) e físicas (elevadas temperaturas) [20].

3.5.2 Modos de extração

O modo de extração em SPME pode ser efetuado de três formas diferentes: por extração direta, extração por *headspace* e extração com recurso a uma membrana protetora. A Figura 3.5 exemplifica esses três modos de extração:

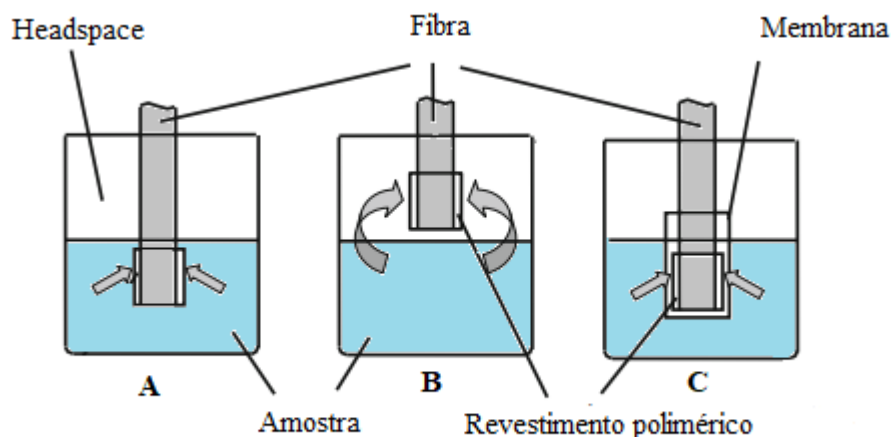


Figura 3.5 – Modos de extração em SPME: A – Extração direta; B – Headspace; C – Utilização de membrana protetora (Adaptado de [20])

Na extração direta o revestimento da fibra é imerso na amostra e os analitos são extraídos diretamente da matriz da amostra. Este modo de extração é mais utilizado quando os compostos em estudo não são tão voláteis.

Na extração por *headspace*, os analitos são extraídos da fase gasosa acima da matriz da amostra. A razão primária para este modo é a proteção da fibra de interferentes com elevado peso molecular presentes na matriz da amostra, como por exemplo proteínas. Também permite modificações na matriz, como ajustamentos de pH, sem interferir com a fibra. Este modo de extração é mais aconselhado para compostos de elevada volatilidade [16].

Para compostos voláteis, geralmente os tempos de equilíbrio são menores no modo *headspace* do que por imersão direta, pois existe já uma considerável quantidade de analitos presentes em *headspace* e pelo facto de os coeficientes de difusão na fase líquida serem inferiores aos da fase gasosa [22].

O terceiro modo de extração é o menos utilizado que consiste no uso de uma membrana seletiva que possibilita apenas a passagem de certos analitos. A utilização deste modo é mais necessária quando os analitos de interesse são pouco voláteis e não permitem extrair por *headspace* e a matriz da amostra se encontra com interferentes de elevado peso molecular e outros contaminantes o que conduz ao uso de uma membrana de forma a proteger a fibra. Todavia, este processo comparativamente aos outros dois apresentados anteriormente é mais lento dado que para haver difusão dos analitos até ao revestimento há necessidade de atravessar a membrana [20].

3.5.3 Tempo de extração

O tempo de extração é definido como o tempo que é necessário para a quantidade de analito alcançar o equilíbrio entre a amostra e o revestimento da fibra.

O tempo de equilíbrio é definido como o tempo que após uma quantidade de analito extraída se mantém constante, independentemente do aumento do tempo de extração e dentro do limite do erro experimental. Fatores como o tamanho dos analitos, o tipo de fibra selecionada, a temperatura de extração, o uso de agitação, e a concentração do analito na amostra têm preponderância no tempo que é necessário para se atingir o equilíbrio.

Não obstante, é necessário ter em conta que, há casos em que uma grande diminuição na curva da massa extraída em função do tempo de extração não corresponde ao tempo de equilíbrio. Esse fenómeno tem lugar quando se trabalha no modo de extração *headspace* em amostras aquosas, onde um rápido aumento da curva de equilíbrio, condizente à extração de analito presente no *headspace*, é seguido por um aumento lento relativo à transferência de analito da matriz aquosa, através da *headspace*, atingindo o equilíbrio mais tarde [16].

3.5.4 Temperatura de extração

A temperatura tem um papel importante na otimização do SPME. Um aumento da temperatura de extração causa um aumento na velocidade de extração, mas ao mesmo tempo provoca um decréscimo na constante de distribuição, isto é a concentração de analito na fase aquosa diminui. Este princípio é essencialmente aplicado quando o modo de extração a ser utilizado é de imersão direta, pois as altas temperaturas provocam a evaporação dos analitos conduzindo a uma diminuição da concentração dos mesmos na matriz.

Em contrapartida, no modo de extração por *headspace* o aumento da temperatura vai atuar na pressão de vapor dos analitos favorecendo o coeficiente de distribuição relativo ao *headspace*, uma vez que há movimento dos analitos presentes na matriz da amostra para o *headspace* contribuindo para o seu contacto com o revestimento da fibra [22].

3.5.5 Tempo de desadsorção

O instrumento que mais tem sido utilizado com a técnica de SPME é o cromatógrafo gasoso. Após o processo de extração segue-se o processo de desadsorção, no qual a agulha é inserida no injetor do GC expondo a fibra para se dar a desadsorção dos analitos.

Em relação ao tempo de desadsorção, este deve ser o suficiente para que os compostos sejam desadsorvidos na totalidade da fibra garantindo desta forma que não ocorre *carry-over*, ou seja, que não haja efeitos de transferência de analitos em injeções posteriores [24].

3.5.6 Agitação

Em amostras gasosas, o tempo necessário para atingir o equilíbrio é menor do que em relação a amostras aquosas. A esse tempo a razão associada é a limitação pela velocidade de difusão dos analitos para o revestimento [20].

A manipulação do parâmetro da agitação, tem um papel semelhante ao parâmetro de temperatura de extração, pois o aumento de agitação e de temperatura, vão provocar uma maior eficiência de extração, diminuindo o tempo necessário para se atingir o equilíbrio. No entanto, com ou não realização de agitação, pelo modo de extração por *headspace* ocorrem similaridades verificadas em amostras gasosas, onde mesmo antes de se iniciar o processo de extração, a maioria dos analitos já se encontra na fase gasosa. Como tal, o uso de agitação pode ter maior preponderância na eficiência de extração no modo de imersão direta onde é necessária agitação para promover uma maior facilidade no transporte de massa entre a amostra aquosa e a fibra.

Nos ensaios manuais, a agitação magnética é mais utilizada na técnica de SPME, e consiste na colocação de um agitador magnético dentro do *vial*; uma alternativa automatizada é o uso de um *vórtex* que reproduz um movimento circular no *vial* contendo a amostra [22].

Ao utilizar a agitação no processo de extração há que ter em conta outras variáveis adjacentes à eficiência de extração, ou seja, há que identificar a agitação mais adequada que possa aumentar a eficiência de extração sem danificar a fibra e, por conseguinte, diminuir o tempo de vida útil da mesma.

3.5.7 Salting Out

Comumente mais utilizada na técnica de extração por *headspace*, a adição de sal aumenta a força iónica da fase aquosa de uma amostra, diminuindo a solubilidade dos analitos presentes na matriz, o que conduz a uma migração dos mesmos para *headspace* aumentando a eficiência de extração. O efeito deste parâmetro tem uma acentuação maior, particularmente, para compostos polares e voláteis.

Porém, uma adição de sal a amostras contendo analitos com elevadas constantes de distribuição, pouco ou nada, vai melhorar a eficiência de extração podendo até mesmo criar picos interferentes.

Em relação aos compostos a serem estudados nesta tese, o esperado é um impacto pouco considerável ao adicionar o sal, e tal se justifica pela pouca solubilidade dos analitos de interesse com a matriz aquosa e pela sua natureza apolar [18, 22, 26].

Capítulo 4. Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa

4.1 Cromatografia Gasosa

4.1.1 Introdução

A cromatografia é uma técnica analítica bastante utilizada na identificação, determinação e separação de compostos químicos em misturas complexas. Descoberta pela primeira vez em 1903, pelo botânico russo, M.Tswett, a técnica foi aplicada para separar os vários pigmentos de plantas por uma coluna de vidro empacotada com carbonato de cálcio, CaCO_3 . Nos anos 40, os primeiros avanços nos fundamentos teóricos da cromatografia foram estabelecidos pelo trabalho de A.J.P Martin e Singe, onde é sugerida a possibilidade da existência de uma fase móvel gasosa para compostos voláteis. Contudo foi em 1952 que surgiu verdadeiramente a invenção da cromatografia gasosa, GC, e consequente maior desenvolvimento, com a publicação de Martin e A.T James [27, 28].

O princípio básico de um processo cromatográfico baseia-se, na distribuição de uma mistura entre duas fases distintas, uma fase móvel e uma fase estacionária. A fase móvel (líquida ou gasosa) dissolve e transporta os compostos da mistura movimentando-se através da fase estacionária (líquido viscoso ou sólido) que se encontra fixa no interior de uma coluna. A partição dos compostos entre as duas fases vai depender das propriedades físico-químicas dos analitos presentes na amostra, o grau de interação com a fase estacionária, resultando daí diferentes velocidades de migração e a sua separação no final da coluna [29].

O processo pelo qual ocorre a separação é designado por eluição, podendo ser observado pela Figura 4.1, a partir de uma amostra com dois compostos diferentes e o seu deslocamento ao longo do cromatógrafo. A fase móvel transporta os compostos ao longo da fase estacionária, onde os analitos com maior afinidade com esta vão ficando retidos e deslocam-se a uma velocidade menor, em contraste com os outros que tendo maior afinidade com a fase móvel e menor peso molecular possuem uma velocidade de migração maior. As moléculas mais rápidas, naturalmente, abandonam a coluna mais cedo obtendo tempos de retenção mais pequenos, ou seja, o correspondente aos primeiros picos, seguindo-se os analitos que ainda se encontram a deslocar pela coluna, favorecendo assim a separação. A largura dos picos difere consoante os analitos, as condições usadas e a coluna cromatográfica.

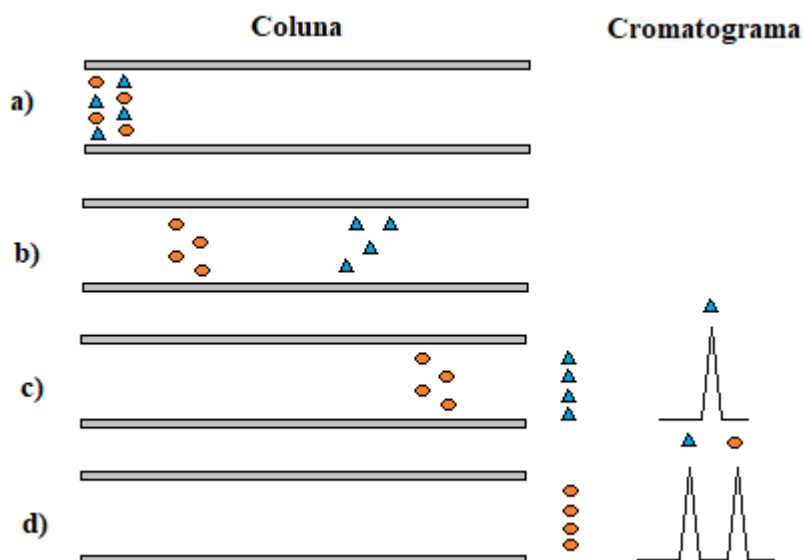


Figura 4.1 – Separação de uma amostra através de um processo cromatográfico: a) Injeção da amostra no cromatógrafo; b) Deslocação através da coluna dos compostos; c) Primeiro pico no cromatograma; d) Último composto a sair da coluna e respectivo aparecimento do pico no cromatograma (Adaptado [30])

4.1.2 Fundamentos Teóricos

Para perceber o comportamento da metodologia cromatográfica, especificamente, o cromatógrafo gasoso e compreender as suas potencialidades é necessário conhecer os conceitos básicos que se encontram ligados ao seu funcionamento.

Vários destes parâmetros através da sua otimização, conduzem a melhores resultados analíticos.

- **Constante de Distribuição, K**

Ao longo da coluna, fatores como a temperatura na coluna cromatográfica, as propriedades dos compostos ou o tipo de fase estacionária vão influenciar a separação dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária. A relação de partição, de um qualquer composto, entre as duas fases é dada pela constante de distribuição, K, definida como a razão entre a concentração na fase estacionária e a concentração na fase móvel, como demonstra a Equação 4.1:

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad (\text{Equação 4.1})$$

No qual os termos C_S e C_M , representam a concentração do analito na fase estacionária e a concentração do analito na fase móvel, respetivamente.

O sucesso na separação dos compostos, está dependente das constantes de distribuição, onde o K tem de ser diferente para cada um, caso contrário, vai ocorrer co-eluição, indicativo que os compostos têm o mesmo tempo de retenção [30].

- **Tempo de Retenção, t_R**

Um dos parâmetros mais importantes é o tempo de retenção, t_R , definido como o tempo necessário que um analito demora a percorrer a coluna cromatográfica ou ainda o tempo entre a injeção da amostra e o aparecimento do pico cromatográfico máximo, após chegar ao detetor.

O tempo morto, t_M , é o tempo que as moléculas passam na fase móvel, ou seja, o tempo necessário para que os compostos que não sejam retidos pela fase estacionária sejam detetados. A diferença no tempo de retenção para cada analito, verifica-se no tempo que cada um permanece na fase estacionária da coluna, sendo este designado como tempo de retenção ajustado, t'_R [30].

Pode ser determinado matematicamente a partir da Equação 4.2:

$$t'_R = t_R - t_M \quad (\text{Equação 4.2})$$

Na Figura 4.2, está ilustrada a distinção entre os três termos:

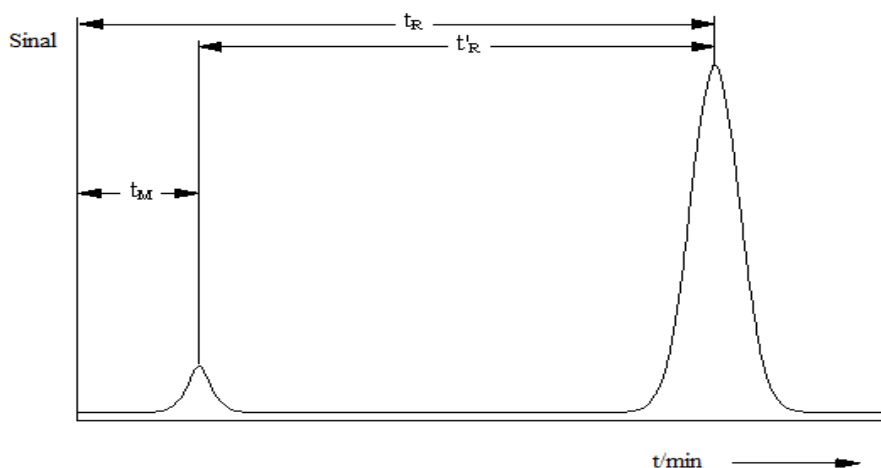


Figura 4.2 – Modelo representativo de um cromatograma (Adaptado de [31])

- **Fator de Retenção, k**

O fator de retenção, k , também conhecido por razão de partição ou ainda fator de capacidade, é uma medida usada para descrever a velocidade de migração de um analito na coluna cromatográfica, ou seja, é a afinidade de um componente para com a fase estacionária permitindo comparar com outros compostos, e pode ser determinada pela Equação 4.3.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} \quad (\text{Equação 4.3})$$

Onde V_S é o volume da fase estacionária e V_M o volume da fase móvel.

Se a fase móvel percorrer a coluna suficientemente devagar, de forma a estar próxima do equilíbrio, a razão C_S/C_M pode ser substituída pela constante de distribuição, K . Desta forma, a equação poder ser representada do seguinte modo:

$$k = K \frac{V_S}{V_M} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Quanto maior o fator de retenção, maior é a quantidade de analito na fase estacionária, isto é, fica retido durante mais tempo na coluna, e consequentemente considera-se k como uma medida de retenção [25, 26].

- **Fator de Seletividade, α**

A separação de dois picos pode ser afetada pelo coeficiente de distribuição, como pela eficiência da coluna. Uma medida de separação relativa entre dois analitos adjacentes, é designada por fator de seletividade, também conhecido por fator de separação, α , e pode ser expressa do seguinte modo:

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{Equação 4.5})$$

Onde K_1 e K_2 , são o coeficiente de distribuição dos analitos 1 e 2, respetivamente; e k_1 e k_2 são os fatores de retenção, de modo respetivo, dos analitos 1 e 2.

Pela definição, α é sempre superior a 1, o que indica que o analito 2 fica retido mais tempo no sistema cromatográfico que o analito 1. Todavia, se o fator de seletividade for igual a 1, ocorre o fenómeno designado de co-eluição, já supracitado no subcapítulo 4.1.1 [34].

- **Eficiência da Coluna, N**

A eficiência está relacionada com a capacidade da coluna de produzir picos bem definidos. Pode ser medida através do número de pratos teóricos, N , conceito com base nas colunas de destilação, apesar de na prática uma coluna cromatográfica não dispor de pratos de destilação. Quanto maior for o número de pratos, menor será a largura das bandas e melhor é a eficiência. O número de pratos teóricos pode ser calculado usando a seguinte equação:

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (\text{Equação 4.6})$$

Onde t_R é o tempo de retenção do pico e W_h a largura do pico a meia altura.

Outra medida da eficiência da coluna é a altura equivalente de um prato teórico, HETP, ou simplesmente altura do prato, H, sendo determinada da seguinte forma:

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Equação 4.7})$$

Onde L é o comprimento da coluna. Uma menor altura dos pratos, vai corresponder a um maior número de pratos por metro, garantindo desta forma uma maior eficiência da coluna.

O calculo de H, apesar de permitir determinar a eficiência da coluna, não explica como funciona o alargamento das bandas. Como tal, surge a equação de Van Deemter que explica este fenómeno. A equação expressa a altura de um prato da seguinte forma:

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad (\text{Equação 4.8})$$

Onde A, B e C são constantes e \bar{u} é a velocidade linear da fase móvel.

A Figura 4.3, corresponde a uma representação gráfica, para uma melhor compreensão, da equação de Van Deemter:

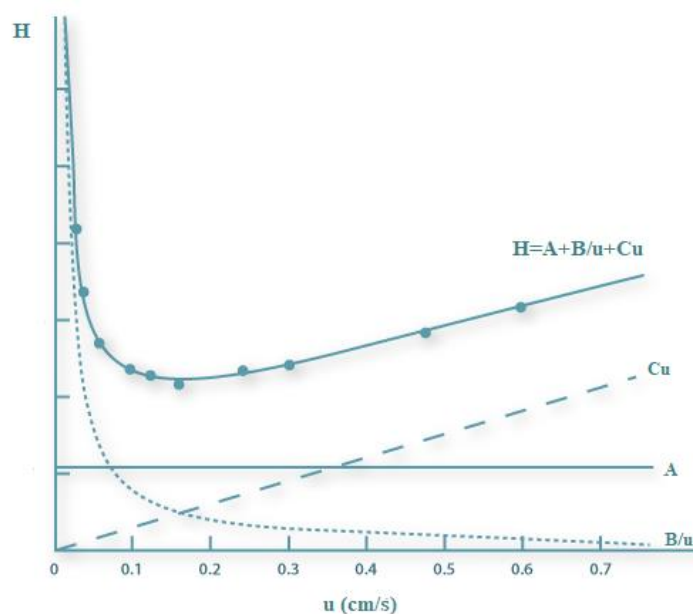


Figura 4.3 – Representação gráfica da equação de Van Deemter (Adaptado de [71])

O termo A corresponde ao alargamento da banda causada pelo efeito de dispersão, também conhecida por difusão de *Eddy*, ou seja, os diferentes percursos que as moléculas de analito percorrem até ao fim da coluna, traduzindo-se em diferentes tempos de percurso.

O termo B/\bar{u} representa o alargamento da banda por difusão longitudinal das moléculas de analito na fase móvel. A difusão é maior para gases em comparação a líquidos, e dessa forma este termo tem um maior impacto no GC. Uma diminuição da difusão em gases envolve um gás de arraste com uma maior densidade, mas em contrapartida influencia a transferência de massa diminuindo-a na fase móvel.

O termo $C\bar{u}$ refere-se ao alargamento da banda causado pelo atraso do analito, devido à transferência de massa entre a fase móvel e a estacionária. A transferência de massa pode ser influenciada por características da coluna como o diâmetro interno da coluna e a espessura do filme da fase estacionária.

Todavia esta equação é inicialmente aplicada para colunas de enchimento com fase estacionária líquida. Deste modo o equipamento GC/MS que tipicamente opera com colunas capilares, é expresso pela equação condensada de Golay:

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + (C_S + C_M)\bar{u} \quad (\text{Equação 4.9})$$

Onde C_S e C_M , descrevem a transferência de massa na fase estacionária e móvel respetivamente.

As modificações na equação condensada prendem-se com a ausência do termo A cujo valor para colunas capilares é nulo e com os efeitos no alargamento dos picos promovido pela difusão na fase gasosa.

Para uma maior eficiência da coluna, o valor de H tem de ser mínimo, dessa forma as colunas trabalham utilizando uma velocidade de gás ideal acima do ótimo de modo a reduzir o tempo de análise [32, 35].

- **Resolução, R_S**

A resolução, R_S , é descrita como uma grandeza que melhor avalia a eficiência de um sistema cromatográfico, e define uma medida da separação entre dois analitos adjacentes, sendo expressa pela Equação 4.10:

$$R_S = 2 \left(\frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_2 + W_1} \right) \quad (\text{Equação 4.10})$$

No qual, t_{R1} e t_{R2} são os tempos de retenção dos picos 1 e 2, respetivamente; e W_1 e W_2 são a largura do pico na base dos analitos 1 e 2, respetivamente.

A resolução também se encontra relacionada com o número de pratos teóricos, fator de seletividade e fator de retenção, podendo ser descrita pela Equação 4.11:

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right) \quad (\text{Equação 4.11})$$

De forma a obter a melhor resolução possível, os três termos têm de ser maximizados. O aumento do tamanho da coluna representa maior eficiência da mesma; com a diminuição da temperatura há uma maior seletividade; e através de um aumento da espessura do filme ou diminuição do diâmetro da coluna permitem um aumento do fator de retenção, vantajoso para compostos voláteis, e deste modo a relação entre os fatores tende para a otimização da resolução [35, 36].

4.1.3 Constituição de um cromatógrafo gasoso

O cromatógrafo gasoso tem na sua constituição seis componentes essenciais: o gás de transporte, o injetor, o forno, a coluna, o detetor e a unidade de aquisição de dados e controlo.

- **Gás de Arraste**

O gás de vapor, também conhecido por gás de arraste, é utilizado para designar a fase móvel. A escolha do gás vai depender da coluna e do tipo de detetor, mas mais importante da velocidade do tempo de análise e da detetabilidade. Este deve possuir como características ainda elevado grau de pureza para impedir a presença de contaminantes na coluna e ser inerte. Os gases geralmente utilizados são o hélio, o hidrogénio e o azoto.

A velocidade e o tipo de gás de transporte possuem um papel relevante na separação cromatográfica, onde a velocidade linear média pode ser descrita pela seguinte equação:

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M} \quad (\text{Equação 4.12})$$

Onde L é o comprimento da coluna e t_M o tempo morto.

Como já mencionado anteriormente, para uma maior eficiência da coluna, o H tem de ser mínimo e para tal utiliza-se uma velocidade acima do ótimo, que pode ser observada pela Figura 4.4, para os três gases de arraste.

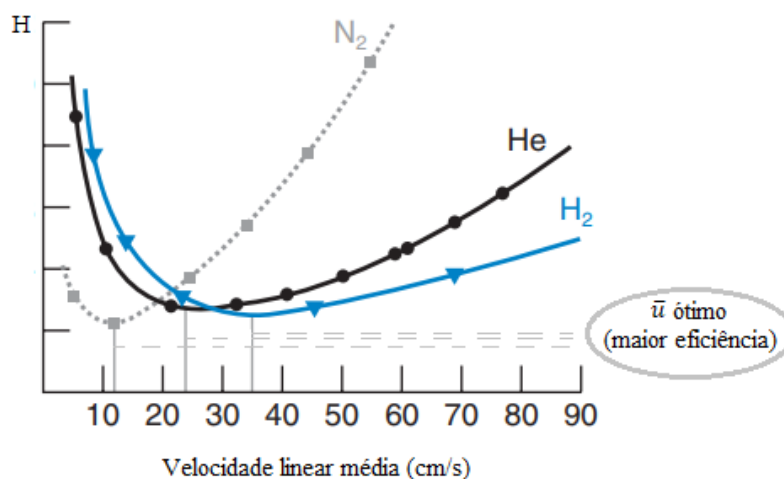


Figura 4.4 – Relação entre o H e a velocidade linear média para o azoto (N₂), hélio (He) e hidrogénio (H₂)
(Adaptado de [42])

O gráfico demonstra que existe um \bar{u} ótimo que corresponde ao valor mínimo de um H na curva. A velocidade linear média para o azoto é mais baixa o que possibilita um maior tempo de análise, ao contrário do hélio e do hidrogénio que possuem um \bar{u} mais elevado promovendo um menor tempo de análise, com uma perda insignificante de eficiência.

Não obstante, o hidrogénio tem como desvantagem o facto de ser explosivo, pelo que o gás de arraste frequentemente mais utilizado seja o hélio [22, 29, 37].

- **Injetor**

Num sistema cromatográfico, a injeção de uma amostra é determinante para garantir resultados com qualidade, podendo a título de exemplo reduzir a resolução na coluna entre outros fatores.

O tipo de injetor deve ser selecionado de forma cuidadosa dependendo da análise a realizar e usado para garantir a máxima eficiência da coluna cromatográfica, com elevada precisão analítica e reprodutibilidade dos resultados. De forma a conseguir uma maior eficiência da coluna é necessário que a amostra, em quantidade adequada, seja introduzida rapidamente e de forma integral, pois uma injeção mais lenta para provocar o alargamento dos picos cromatográficos.

Na cromatografia gasosa, a introdução da amostra na coluna é efetuada sobre a forma de vapor, sendo essa vaporização conseguida através do injetor, mais comumente, do tipo *split/splitless*, representado na Figura 4.5.

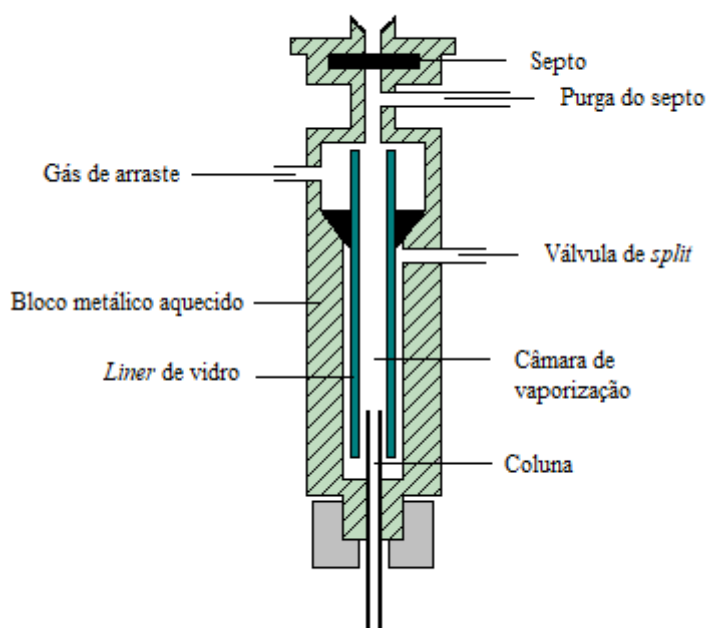


Figura 4.5 – Representação de um injetor do tipo split/splitless (Adaptado de [39])

O modo de funcionamento de um injetor do tipo *split/splitless* é descrito pela inserção da amostra através de um septo de borracha, num injetor aquecido, passando para uma câmara de vaporização, onde se encontra um *liner*, cujo propósito é impedir a degradação e aumentar a vaporização dos analitos presentes, a uma temperatura elevada o suficiente para acontecer a volatilização da amostra. O gás de arraste é introduzido na câmara também, onde vai ocorrer a sua mistura com a amostra.

No modo *split* o injetor divide a amostra em duas partes distintas, onde apenas uma fração da amostra vai para a coluna e a maior fração é eliminada pela válvula de *split*. A relação entre a quantidade de gás de arraste, que transporta a amostra, que sai pela válvula e o fluxo de gás que entra para a coluna, é dada pela razão de *split*.

No caso da análise de amostras com concentrações vestigiais, escolhe-se o tipo de injeção *splitless*, onde a totalidade da amostra vai para a coluna. Neste modo, a válvula de *split* encontra-se fechada aquando da injeção da amostra, na qual o fluxo de gás a entrar é igual ao fluxo que atravessa para a coluna. Contudo, só se encontra fechada num determinado intervalo de tempo manipulável, e otimizado, garantindo assim a eliminação de vestígios que se encontrem presentes na câmara de vaporização [34, 38, 39].

- **Forno**

No GC a relação entre o tempo de retenção e a temperatura é fundamental, onde o forno ocupa um papel de extrema importância como seu constituinte. A coluna reside no interior do forno cuja temperatura é controlada com elevada precisão.

Quanto maior a temperatura, mais rapidamente os compostos são eluídos, isto é, o tempo de retenção é menor e o contrário acontece quando há um decréscimo da temperatura.

A monitorização da temperatura por parte deste componente é fundamental na obtenção do melhor resultado analítico possível, já que o analista muitas vezes lida com amostras de natureza desconhecida, como a quantidade ou a volatilidade dos compostos, entre outros [40].

- **Coluna Cromatográfica**

A coluna cromatográfica, contendo a fase estacionária, é um dos constituintes fundamentais do GC, tendo influência direta no tempo de retenção dos compostos em consequência de fatores como o comprimento, o diâmetro, a temperatura, a estrutura química e a quantidade da fase estacionária da coluna cromatográfica.

Existem dois tipos de colunas que podem ser aplicadas num cromatógrafo gasoso: as colunas de empacotamento e as colunas capilares.

As colunas empacotadas podem ser produzidas a partir de vidro, aço inoxidável ou alumínio, de 2 a 6 metros de comprimento, possuindo ainda um diâmetro interno compreendido entre os 2 e os 4 milímetros. O empacotamento da coluna é feito com recurso a pequenas partículas esféricas e uniformes, com impacto na eficácia da separação dos compostos, revestidas com uma camada de fase estacionária. O uso deste tipo de coluna tem como vantagem uma maior capacidade de amostra.

Porém, no GC/MS, geralmente, a escolha da coluna a utilizar recai sobre as colunas capilares. Apresenta como vantagens uma maior resolução, menores tempos de análise e uma maior sensibilidade em comparação com as colunas de empacotamento.

Têm um comprimento entre os 25 e 150 metros e entre 0,25 e 0,75 milímetros de diâmetro interno. A constituição da coluna é apresentada na Figura 4.6.

A constituição de uma coluna capilar envolve três partes distintas: o revestimento em poliimida, com o objetivo de proteger e suportar a coluna a fatores externos, um tubo de sílica fundida e ligado às paredes internas deste tubo está um filme fino, designado por fase estacionária.

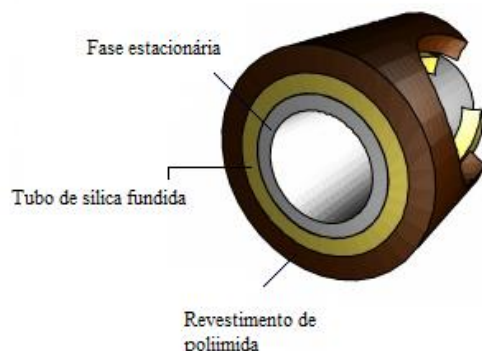


Figura 4.6 – Representação de uma coluna capilar (Adaptado de [41])

A fase estacionária de uma coluna influencia a seletividade e a sua escolha vai depender do tipo de aplicação pretendida. Muitas das fases estacionárias utilizadas têm a estrutura geral do polisiloxano, representado na Figura 4.7:

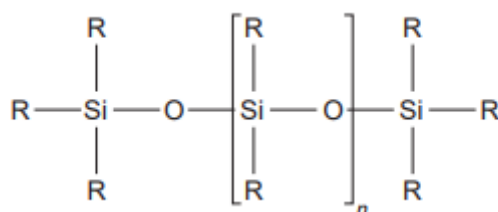


Figura 4.7 – Estrutura geral da fase estacionária de polisiloxano (Adaptado de [42])

O tipo de substituintes da cadeia principal e a quantidade destes vai distinguir a fase e as suas propriedades. Outra característica importante é a espessura do filme, uma vez que no caso do estudo de compostos voláteis, uma espessura maior garante uma maior capacidade de retenção [35, 42].

- **Detetor**

O detetor de um cromatógrafo gasoso deteta os analitos que são eluídos da coluna com o propósito de converter a informação que recebe num sinal elétrico, sendo enviado, posteriormente, para uma unidade de aquisição de dados.

As características mais importantes que devem ser apresentadas num detetor são a sensibilidade para detetar em quantidades residuais, ser fiável, e demonstrar linearidade na relação sinal/concentração ao longo de uma vasta gama de concentrações.

Os detores mais comumente utilizados são o detetor de captura eletrónica (ECD), o detetor de ionização de chama (FID) e o espectrómetro de massa (MS), dependendo a sua escolha para o tipo de aplicação pretendida.

De salientar, que o detetor a utilizar no âmbito deste trabalho será o MS onde irá ser abordado mais em detalhe no ponto 4.2 [22, 31].

- **Unidade de Aquisição de Dados e Controlo**

Esta última unidade é responsável pela receção, processamento e tratamento de dados onde, por exemplo, permite a identificação de compostos com recurso a uma base de dados de referência, como a desenvolvida pela NIST, e também do controlo e manipulação de diferentes variáveis como programas de temperatura, velocidade do fluxo do gás de transporte, escolha do modo *split/splitless* entre outros, através de um ou mais *softwares*.

4.2 Espectrometria de Massa

4.2.1 Introdução

A espectrometria de massa desde o seu primeiro aparecimento, em 1912, por J.J Thomson, evoluiu exibindo-se como uma das técnicas analíticas de maior importância. Destacando-se como uma técnica que faculta informações qualitativas e quantitativas dos mais variados compostos de interesse (orgânicos, inorgânicos, entre outros) em amostras complexas, ao nível da sua estrutura molecular, apresentando também possibilidade de fornecer informações de compostos desconhecidos existentes nas amostras [35].

Considerado um método de análise destrutivo, uma vez que após a análise ser efetuada não é possível recuperar a amostra, esta técnica é dividida em três fases, onde tem como particularidade operar a vácuo de forma a impedir a colisão entre iões evitando a sua desfragmentação e mudanças de direção desfavoráveis, para a obtenção de resultados fiáveis e reprodutíveis.

A primeira etapa consiste na produção de iões, podendo ser efetuada a partir de vários métodos diferentes dependendo dos iões em causa. Um desses métodos é a eletroionização, EI, onde as moléculas da amostra são expostas a um feixe de eletrões, levando à perda de eletrões e formação de iões radicais positivos, podendo fragmentar uma ou mais vezes em iões mais estáveis. De seguida, os iões são conduzidos até ao analisador de massas, que através da aplicação de determinadas voltagens, tendo por base a razão massa/carga proporciona a diferenciação dos mesmos.

Por fim, derivado ao elevado número de fragmentos que são analisados e consequente perda de sensibilidade, será necessário recorrer à amplificação do sinal com recurso a um

multiplicador eletrônico. Este amplifica o sinal correspondente à abundância relativa dos íons em função da sua razão massa/carga. A informação é enviada para um sistema de recepção e processamento de dados, sendo representada a partir de um espectro de massa [44].

4.2.2 Constituição de um espectrómetro de massa

Como já foi mencionado na introdução à espectrometria de massa, um espectrómetro de massa é constituído por três importantes componentes: a fonte de ionização, o analisador de massas e o detetor de íons.

- **Fonte de Ionização**

As moléculas nas amostras têm de ser, primeiramente, ionizadas de forma a serem detetadas e analisadas num espectrómetro de massa. Uma variedade de técnicas de ionização é utilizada na espectrometria de massa, e enquanto algumas técnicas são mais energéticas e causam uma extensa fragmentação, outras são mais “macias” e apenas produzem íons de espécies moleculares.

A electroionização, EI, e a ionização química, CI, são as duas técnicas, mais utilizadas e adequadas para GC/MS, assim o seu uso é limitado a compostos suficientemente voláteis e termicamente estáveis. Destas duas técnicas, a mais utilizada a nível global é a de electroionização, sendo definida uma abordagem mais detalhada neste subcapítulo para esta técnica. Na Figura 4.8, está representado o mecanismo de ionização, EI.

A fonte de ionização consiste numa pequena câmara, onde os analitos, vindos da coluna capilar, são bombardeados com um feixe de eletrões altamente energizados entre os 50 e 70 eV.

A emissão dos eletrões é produzida a partir de um filamento incandescente feito de uma liga de tungsténio-rénio, na direção da fonte iónica. A interseção entre o feixe e as moléculas da amostra, provenientes de trajetórias perpendiculares, tem lugar no centro da fonte, onde algumas das moléculas perdem um eletrão, ficando positivamente carregadas.

Para os compostos orgânicos a energia de ionização situa-se entre os 5 e 15 eV, deste modo, o método apresentado contém um excesso de energia que não só expulsa um ou dois eletrões da molécula, como fornece energia suficiente para ocorrer a fragmentação do primeiro ião formado, produzindo íons fragmento.

Por fim, os íons formados são submetidos a um campo magnético que os conduz para fora da fonte, sendo feita a sua focalização para o analisador de massas, com auxílio das lentes de focagem [44].

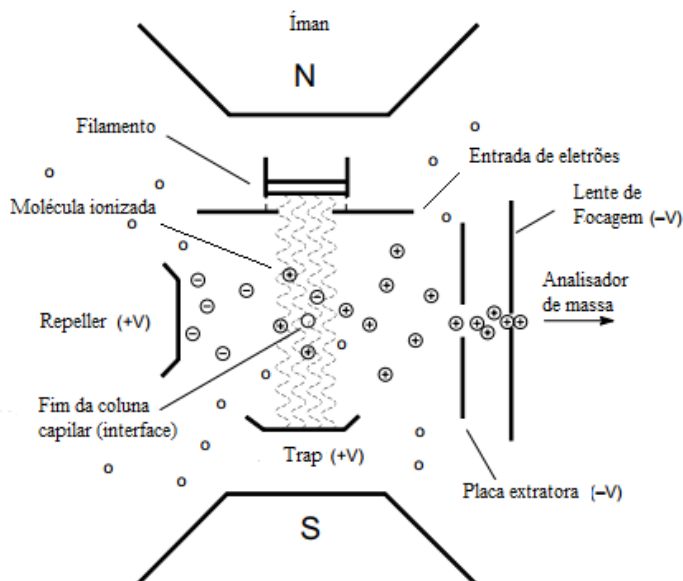


Figura 4.8 – Representação esquemática de uma fonte de ionização EI (Adaptado de [44])

- **Analizador de massas**

Uma vez que os iões moleculares e iões fragmentos se encontram misturados, provenientes da fonte de ionização, é necessário identificar e separar essa informação.

Em particular, a separação é efetuada pela medição das propriedades físicas de cada ião a partir da razão massa/carga, m/z , resultante de um campo elétrico ou magnético por parte do analisador. Existem inúmeros analisadores, onde a diferença na escolha do tipo de analisador assenta no modo como cada campo (elétrico ou magnético) é utilizado de forma a alcançar a separação.

No GC/MS, o analisador de massas mais utilizado é o quadrupolo, sendo abordado em maior detalhe. Não obstante, outros tipos de analisadores podem ser vistos num espectrómetro de massa com menção ao *ion trap* e ao *time-of-flight*.

O quadrupolo, caracterizado na Figura 4.9, é composto por quatro hastes elétricas estritamente alinhadas, a uma determinada distância e paralelas entre si. Os pólos opostos estão ligados, em pares, a geradores de rádio-frequência e de corrente contínua fazendo com que seja aplicada uma voltagem que afeta a trajetória dos iões que atravessam o quadrupolo por entre as quatro hastes. Para uma dada voltagem, somente alguns iões com uma determinada razão m/z reagem de forma estável mantendo a trajetória definida, ao passo que outros tornam-se instáveis acabando por embater nas barras neutralizando-se.

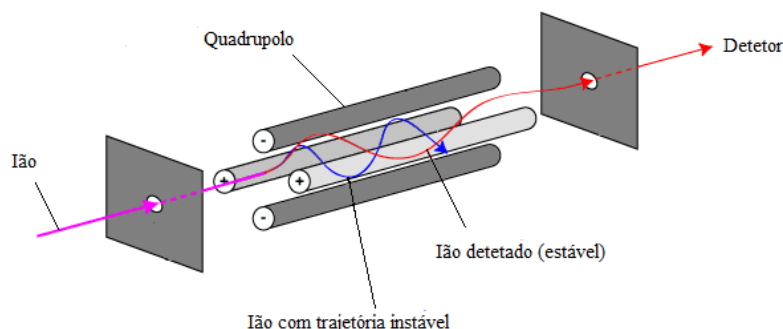


Figura 4.9 – Representação esquemática de um quadrupolo (Adaptado de [48])

Os quadrupolos são bastante utilizados apresentando como vantagens o baixo custo, a aplicação com outros sistemas analíticos, a facilidade de operar em análises tanto qualitativas como quantitativas e manuseamento por parte do operador.

Outra das características apreciada é a capacidade de aumentar a sensibilidade através do modo de operação de monitorização por íons selecionados (SIM). Este modo de operar, permite que apenas só determinados valores de m/z sejam detetados, escolhidos pelo analista e representativo dos analitos a analisar. A sensibilidade deste modo pode ser superior entre 10 a 100 vezes comparativamente ao modo *Full Scan*.

Contrariamente, em *Full Scan*, todos os compostos presentes na amostra dentro dos limites da gama de massas m/z definida pelo analista são detetados sendo que a informação obtida dessa análise é representada através de um espectro de massa [32, 33, 34].

- **Detetor de Íões**

Os íões após serem gerados na fonte de ionização e separados de acordo com o valor de m/z no analisador de massas, estes irão ser recebidos por um detetor transformando-se num sinal possível de ser quantificado. Os detetores são capazes de gerar uma corrente elétrica proporcional à abundância dos íões presentes.

No GC/MS, como o processo de EI é pouco eficiente, isto é, o número de íões positivos que chegam ao detetor é muito pequeno, será necessário a amplificação do sinal. Assim sendo, neste equipamento, a forma de deteção mais utilizada é o multiplicador de eletrões.

Existem dois tipos de multiplicador de eletrões: o contínuo e o discreto. O multiplicador eletrónico de dínodo contínuo apresenta a forma de um canal num tubo feito de vidro revestido, onde as paredes interiores, constituídas por dínodos, possuem uma resistência elétrica uniforme ao longo do seu comprimento. A colisão dos íões nas paredes internas irá libertar eletrões secundários, acelerados por um campo elétrico, causando mais colisões ao longo do tubo amplificando assim o sinal. Por outro lado, o multiplicador de eletrões de dínodo discreto é constituído em série, por 12 a 20 dínodos, ligados eletricamente entre si, com boas propriedades

de emissão secundária. O íon inicial colide no primeiro dínodo, resultando na emissão de elétrons acelerados por uma certa voltagem, que irão colidir com o segundo dínodo e assim sucessivamente, amplificando o sinal como é ilustrado na Figura 4.10 para os dois tipos de multiplicador abordados.

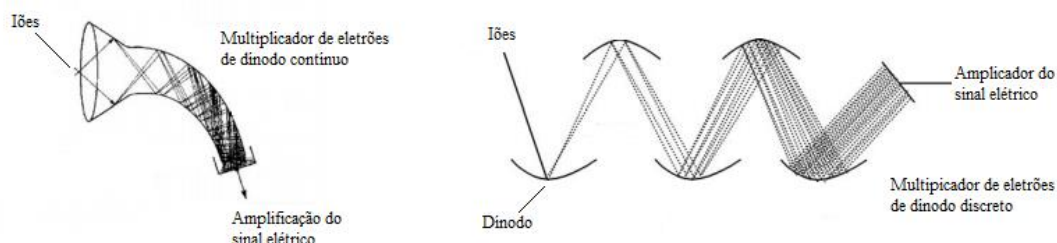


Figura 4.10 – Representação esquemática de um multiplicador de elétrons: contínuo e discreto (Adaptado de [45])

A amplificação do sinal no multiplicador de elétrons, pode atingir um valor superior até 10^6 , dependendo da voltagem aplicada. Por fim, os resultados obtidos passam para uma unidade de aquisição e processamento de dados, já referida neste capítulo [32, 33, 34].

4.2.3 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa

A cromatografia gasosa/ espectrometria de massa, GC/MS, consiste na junção das duas técnicas analíticas, já abordadas neste capítulo: a cromatografia gasosa (GC) acoplada à espectrometria de massa (MS).

O primeiro GC/MS surgiu nos anos 50, desenvolvido por Roland Gohlke onde a combinação entre o cromatógrafo gasoso, cujo objetivo é a separação de analitos, e o espectrómetro de massa, onde o seu propósito compreende a identificação e quantificação dos compostos, possibilita a aplicação nas mais variadas áreas como em análises ambientais, em processos industriais, controlo de qualidade na indústria farmacêutica, análises forenses e toxicológicas, entre outros [35].

Neste momento, a técnica GC/MS é uma das mais utilizadas ferramentas de análise, principalmente em voláteis, alcançando informações quantitativas e qualitativas com baixos limites de deteção, de forma fiável e eficaz [25, 35].

O sistema típico desta técnica é representado na Figura 4.11:

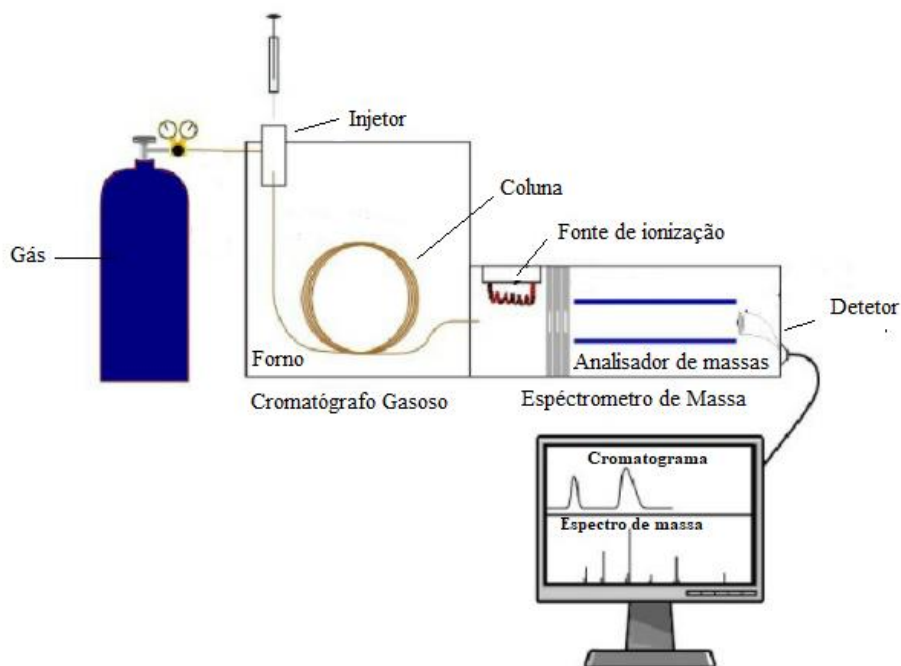


Figura 4.11 – Esquema tipo de um sistema de GC/MS (Adaptado de [72])

Como ilustrado na Figura 4.11, a mistura da amostra é injetada no cromatógrafo gasoso, onde é vaporizada e conduzida por um gás ao longo da coluna, separando-se em virtude das interações dos vários compostos presentes na mistura com a fase estacionária. De seguida, estes compostos, separadamente, atravessam para o interior do espectrómetro de massa através de uma interface que permite reduzir a pressão antes da entrada na fonte de ionização, onde as moléculas serão ionizadas e os iões daí resultantes são detetados, num detetor. Por fim, a informação é processada e armazenada, a partir de uma unidade de aquisição e de processamento de dados.

Capítulo 5. Validação de Métodos de Ensaio

5.1 Introdução

Cada vez mais é exigido, na sociedade moderna, às instituições atingir os patamares de excelência de qualidade em análises químicas através da sua comparabilidade, rastreabilidade e ainda confiabilidade, não obstante que a obtenção de resultados analíticos não confiáveis pode provocar prejuízos financeiros e perda de credibilidade.

Para garantir que um método analítico cumpra os objetivos pretendidos com um desempenho consistente obtendo resultados interpretáveis, robustos, e reprodutíveis consoante as condições definidas, vai ser necessário proceder à sua validação.

A validação de um método de ensaio permite determinar os requisitos analíticos e as características de desempenho de um método, assegurando que as especificidades são cumpridas e garantindo que o método aplicado é robusto. Com vista a implementar a validação de um método, o laboratório tem de seguir uma norma ou um guião que indique os requisitos de gestão e técnicos dos métodos de ensaio. De referir que a regulamentação a seguir na implementação de um método pode deferir da entidade reguladora de cada país [49, 50].

Dependente do tipo de método de ensaio em causa, os requisitos mínimos para a sua validação são os seguintes:

- Seletividade/Especificidade;
- Limites de deteção e quantificação;
- Linearidade e Gama de trabalho;
- Sensibilidade;
- Precisão;
- Exatidão.

O processo de validação abrange o estudo de parâmetros por avaliação direta e por avaliação indireta [51].

5.2 Parâmetros de avaliação indireta

5.2.1 Seletividade/Especificidade

A seletividade de um método é a sua capacidade de detetar e identificar o analito de interesse numa matriz complexa, sem interferência dos outros compostos. A causa destas interferências pode-se dever à quantificação ou identificação dos analitos.

Uma forma de testar este parâmetro é fortificando as amostras com contaminantes que tipicamente se esperam que estejam presentes nas amostras e verificar se existem ou não alterações. No caso de existirem alterações o método deverá permitir identificações e correções.

Neste trabalho em estudo, a seletividade é dada pelo método de extração SPME, pela coluna cromatográfica que permite a separação dos compostos a analisar e pelo uso do modo SIM na aquisição de dados pelo espectrómetro de massa.

Já um método é considerado específico quando consegue medir com precisão e especificamente o analito de interesse na presença de outros compostos que se espera que estejam presentes na matriz da amostra. Este parâmetro na prática pode ser avaliado pela análise de misturas de matrizes complexas, tal como através da realização de testes de recuperação.

Dependendo do tipo de metodologia analítica e dos analitos de interesse em estudo, um método analítico pode ser denominado de seletivo e específico quando após os ensaios de recuperação, se verificar que as taxas de recuperação são próximas de 100% [51, 52].

5.2.2 Quantificação

Para se desenvolver um método quantitativo é necessário interpretar os dados experimentalmente obtidos, e como tal é preciso definir retas de calibração, analisar os limiares analíticos de quantificação e deteção e ainda estudar a sensibilidade.

- **Curvas de calibração**

A calibração é um parâmetro muito importante num método quantitativo, pois permite estabelecer uma relação entre um sinal medido pelo sistema de medida, altura ou área do pico cromatográfico, e a concentração ou quantidade de analito. Esta relação é expressa através de uma representação matemática permitindo a construção de uma curva de calibração.

A calibração analítica do equipamento, em métodos instrumentais de análise processa-se de forma geral, pelo método do padrão externo, da seguinte maneira: o analista prepara uma série de soluções de calibração em que as concentrações do composto são conhecidas, com as soluções padrão distribuídas equitativamente pela gama de trabalho estabelecida de modo a que as amostras do analito contendo uma certa concentração se apresentem dentro deste intervalo pré-estabelecido. As soluções padrão de calibração são medidas num equipamento analítico, nas mesmas circunstâncias das amostras a analisar. Com os dados experimentais obtidos, é realizado um gráfico de calibração correspondente ao sinal do equipamento em função da concentração. Para a elaboração da curva de calibração é necessário no mínimo haver 5 pontos de calibração.

Adicionalmente, existem mais outros dois modos de efetuar calibração analítica cuja realização é mais adequada para condições específicas. O método do padrão interno é efetuado quando existem variações do tamanho da amostra analítica ou variações do volume de injeção

cromatográfica ou ainda variabilidade da precisão do método por interferência da matriz em análise. Enquanto que o método de adição de padrão, pode ser usado quando: existem poucas amostras a analisar; o composto a analisar se encontra presente em matrizes complicadas; a inexistência de um branco da amostra e a variabilidade da resposta do analito de interesse em matrizes diferentes.

É desejável que a calibração analítica se realize a par das amostras a analisar, devendo existir critérios de aceitação definidos internamente relativos à linearidade e à estabilidade entre calibrações. A norma ISO 8466-1 deve-se utilizar como referência nas calibrações, recomendando as regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados como controle. No método dos mínimos quadrados (Anexo III), representa-se no eixo vertical, ou eixo yy, a resposta do equipamento e no eixo horizontal, ou eixo xx, as concentrações dos padrões, uma vez que é assumido que o erro associado ao valor da concentração são desprezáveis em relação ao erro do equipamento [51].

- **Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade do método analítico para fornecer uma resposta que seja diretamente proporcional à concentração do analito, dentro de uma faixa de concentração.

Pela norma ISO 8466-1, a linearidade pode ser avaliada pelo teste de Mandel (Anexo IV), ou através da análise de resíduos (Anexo III). Igualmente são efetuados os testes de Rikilt (Anexo V) e das áreas normalizadas (Anexo VI), no estudo da linearidade, de forma a avaliar se existe a necessidade de realizar uma reta de calibração em cada sequência de análises, ou se se pode optar pelo método de calibração pelo fator de resposta.

- **Gama de trabalho**

A gama de trabalho de um método analítico corresponde ao intervalo entre a concentração limite mais baixa e a concentração limite mais alta de analito presente na amostra que podem ser identificados e detetados, com precisão, exatidão e linearidade requeridas, sob o método de ensaio aplicado.

Quando a metodologia utilizada envolve curvas de calibração, a gama de trabalho tem de ser avaliada podendo usar-se o teste de homogeneidade das variâncias (Anexo VII). Caso a curva de calibração apresente um modelo linear é aconselhável usar a norma ISO 8466-1, no entanto se apresentar um modelo polinomial de 2º grau utiliza-se a norma ISO 8466-2 [51, 53].

- **Limites analíticos**

- **Limite de detecção (LOD)**

O limite de detecção, LOD, é a concentração mínima de analito na amostra que pode ser detectado com considerável segurança, mas não necessariamente quantificado como valor exato.

O conceito de limite de detecção também pode ser definido como a concentração mínima que se verifica possível de se distinguir do branco, ou seja de uma amostra que tem a mesma matriz, mas não contém o analito.

Em termos quantitativos este parâmetro é obtido por três metodologias diferentes:

- A partir da razão sinal/ruído, injetando no cromatógrafo uma solução padrão de um analito de interesse a uma concentração vestigial conhecida, de modo a produzir um sinal diferente do branco no qual deve originar um pico cromatográfico com uma razão sinal-ruído o mais baixo possível, neste caso, um rácio de 3:1. Pode ser calculado em função do limite de quantificação:

$$LOD = \frac{LOQ}{3} \quad (\text{Equação 5.1})$$

- Através da determinação de análises repetidas (ensaios de repetibilidade) de uma série de padrões ou brancos correspondente ao limite inferior da gama:

$$LOD = 3 \times S_{x0} \quad (\text{Equação 5.2})$$

Onde S_{x0} é o desvio padrão associado a várias leituras de padrão ou branco com a concentração mais baixa da gama.

- Ou ainda, através de um método que envolve a utilização de uma calibração linear:

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{m} \quad (\text{Equação 5.3})$$

No qual o termo m corresponde ao declive da reta de calibração e o termo $S_{y/x}$ o desvio padrão residual da reta de calibração.

➤ **Limite de quantificação (LOQ)**

O limite de quantificação, LOQ, corresponde à mais pequena concentração que é medida que se pode quantificar com elevado grau de confiança. Teoricamente, o limite de quantificação deve ser sempre inferior ou igual ao padrão de menor concentração da gama de linearidade. Na prática, corresponde à concentração de padrão mais baixa da curva de calibração que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitável.

Tal como o limite de deteção, o limite de quantificação pode ser calculado de 3 formas diferentes:

- Através da razão sinal/ruído, originando um pico cromatográfico com uma razão sinal/ruído superior a 10:

$$LOQ = \frac{C_P \times 10}{S/N} \quad (\text{Equação 5.4})$$

Onde C_P é a concentração do padrão e S/N a razão sinal-ruído.

- Através de análises repetidas (ensaios de repetibilidade):

$$LOD = 10 \times S_{x0} \quad (\text{Equação 5.5})$$

Onde S_{x0} é o desvio padrão associado a várias leituras de padrão ou branco com a concentração mais baixa da gama.

- E ainda, através do desvio padrão residual da curva de calibração:

$$LOD = \frac{10 \times S_{y/x}}{m} \quad (\text{Equação 5.6})$$

De realçar que das três formas de determinar os limiares analíticos, geralmente a mais utilizada é através dos ensaios de repetibilidade, pois é a que oferece mais segurança nos resultados obtidos. Em relação ao rácio sinal/ruído este apresenta-se como pouco fiável, particularmente, na escolha da região do espectro a analisar sendo dessa forma bastante subjetivo e na determinação do limite de deteção onde por vezes não é possível visualizar o pico de interesse nesse limite de concentração. Enquanto à determinação dos limiares com recurso à curva de calibração esta pode não ser possível de efetuar, pois invariavelmente a escolha do método de determinação vai sempre depender do método analítico em questão [49, 54, 55].

- **Sensibilidade**

A sensibilidade, S , de um procedimento analítico é a capacidade do método para discriminar as pequenas variações na concentração de analito na amostra. Pode-se considerar que um método é sensível quando pequenas variações na concentração originam grandes alterações na resposta medida. Este critério pode ser definido pela Equação 5.7:

$$S = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (\text{Equação 5.7})$$

Onde ΔL é a variação do sinal analítico obtido e ΔC a variação da concentração que está associada à variação do sinal de resposta. Sendo a sensibilidade definida pelo declive da curva de calibração, no caso de estas duas variáveis serem diretamente proporcionais, vai existir linearidade, ou seja, a sensibilidade é dada pelo declive da reta que será constante ao longo de toda a gama de trabalho.

5.2.3 Precisão

A precisão representa a concordância entre os resultados obtidos em ensaios independentes, nas mesmas condições analíticas, repetidos sobre amostras idênticas, permitindo de modo geral avaliar a dispersão dos resultados. O estudo deste parâmetro será mais objetivo no caso de incidir preferencialmente sobre amostras, minimizando os efeitos da matriz.

A avaliação da precisão do método pode ser efetuada de três formas, especificamente, a partir da repetibilidade, da reprodutibilidade e da precisão intermédia.

- **Repetibilidade**

A repetibilidade, ou limite de repetibilidade (r), exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas e consistentes, isto é, medidas efetuadas, no mesmo dia, no mesmo equipamento, pelo mesmo analista, com o mesmo material e reagentes.

A partir da seguinte expressão, r , pode ser avaliado:

$$r = 2,8 \times S_r \quad (\text{Equação 5.8})$$

O termo S_r corresponde ao desvio padrão da repetibilidade para um nível de confiança de 95%. Esta forma de determinação da repetibilidade é posteriormente usada na análise de resultados de duplicados de padrões de controlo. Na prática, os resultados de duas determinações de padrões de controlo efetuadas (X_1 , X_2), são aceites se $|X_1 - X_2| \leq r$, em contrapartida, se o resultado for superior ao limite, deverá ser feita uma análise crítica, e caso haja necessidade a repetição de ensaio, segundo a Norma ISO 5725-2 e ISO 5725-6 [56].

- **Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade, ou limite de reprodutibilidade (R), exprime a precisão de um método realizado da mesma forma, numa sucessão de ensaios idênticos, mas em condições de medição diferentes, como por exemplo diferentes analistas, laboratórios, equipamentos ou em dias diferentes. Recorre-se à seguinte expressão para avaliar, R :

$$R = 2,8 \times S_R \quad (\text{Equação 5.9})$$

Onde S_R é o desvio padrão da reprodutibilidade para um nível de confiança de 95%, e o R é o valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio obtidos nas condições referidas, tal como é referido na situação de determinação da repetibilidade, para ser aceite [56].

- **Precisão intermédia**

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada a partir da mesma amostra, ou amostras idênticas, utilizando o mesmo método, mas predefinindo as condições específicas a variar, tais como: realização por analistas diferentes, variação dos dias de análise ou ainda alteração do equipamento a usar.

Esta medida é a que mais se aproxima da variabilidade dos resultados que ocorrem num laboratório, sendo a mais recomendada a aplicar.

5.3 Parâmetros de avaliação direta

5.3.1 Exatidão

A exatidão consiste num método de avaliação direta, sendo este parâmetro definido como a concordância entre os resultados de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro. Isto é, está designado como a capacidade de um método em dar resultados o mais similar possível ao valor real.

Existem vários processos que podem avaliar a exatidão de um método analítico, nomeadamente, Materiais de Referência Certificados, MRC, ensaios interlaboratoriais ou ensaios de recuperação.

- **Materiais de Referência Certificados**

Os Materiais de Referência Certificados, MRC, consistem em materiais de referência em que o valor de uma, ou mais, propriedades foi certificado segundo um processo tecnicamente válido, tendo uma incerteza e sendo rastreável com um documento pela entidade certificadora.

Ou seja, um MRC vai possuir um valor de concentração para cada parâmetro e uma incerteza associada.

Estes materiais constituem uma excelente ferramenta no controlo externo da qualidade de uma análise para avaliar o desempenho do laboratório, através da comparação entre o valor experimental obtido e o valor da concentração certificado, por uma entidade reconhecida e credível. Uma vez que não se verifique que o resultado obtido esteja dentro do intervalo de concentrações definido pela incerteza do valor de referência vai permitir que seja elaborado um plano de ações corretivas resultando numa reavaliação do ensaio, de modo a obter os resultados desejados.

De realçar, que nem sempre se pode usar este processo porque não se encontram MRC comercialmente disponíveis para certos parâmetros orgânicos [51, 57].

- **Ensaio interlaboratoriais**

A participação em ensaios interlaboratoriais, EIL, permite a um laboratório evoluir tecnicamente e aferir a garantia de qualidade, comparando o seu desempenho com outros laboratórios.

Neste enquadramento, uma entidade organizadora fornece uma amostra para analisar a vários laboratórios, já com condições de trabalho previamente estabelecidas e com os objetivos, seja a determinação de um ou vários parâmetros, bem definidos.

Os ensaios interlaboratoriais podem ser divididos em cinco tipos diferentes:

- Ensaio de aptidão ou competência – Consiste na determinação do desempenho do analista ou do laboratório em si, tendo por base a exatidão e a precisão dos resultados. Existe liberdade de escolher o método de análise.
- Ensaio colaborativo – Determina as características para a realização de um método de análise. Todos os laboratórios participantes utilizam o mesmo protocolo.
- Ensaio comparativo – Compara os vários resultados obtidos com os diferentes métodos de análise. Os protocolos são selecionados consoante a capacidade de cada laboratório.
- Ensaio de consenso ou conformidade – Determina o valor a utilizar. Os vários laboratórios analisam um material ou mais com vista a caracterizar as suas propriedades. Pode servir para futuros estudos ou para controlo de qualidade.
- Ensaio de certificação – Análise de um material proposto a material de referência certificado usando o método mais adequado, permitindo fixar valores reais às diferentes características do mesmo e com um determinado grau de incerteza.

O desempenho nos ensaios interlaboratoriais é avaliado através do Z-score, sendo este uma escala de discordância entre o resultado assumido como verdadeiro fornecido pela entidade organizadora e o resultado obtido pelo laboratório [58].

- **Ensaio de recuperação**

Os ensaios de recuperação são o método mais frequentemente utilizado para a avaliação da exatidão, pois muitas vezes não existem materiais de referência certificados ou ensaios interlaboratoriais que contemplem os compostos a validar. A realização deste método permite verificar se há existência de interferentes numa dada matriz.

Nestes ensaios fortifica-se a matriz da amostra com uma concentração conhecida do analito de interesse, seguindo-se a sua extração e quantificação de forma a verificar a percentagem de recuperação. Esta percentagem é dada pela seguinte equação:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{C_e}{C_t} \times 100 \quad (\text{Equação 5.10})$$

Em que C_e é a concentração do composto na amostra fortificada obtida experimentalmente e C_t a concentração teórica do composto na amostra fortificada.

Estes ensaios de recuperação também podem avaliar a eficiência do processo extrativo, como tal considerando que existe variação da percentagem de recuperação consoante a variação da concentração, é aconselhado que se proceda a estes ensaios usando os dois extremos da gama de trabalho (gama baixa e gama alta). Para além das percentagens de recuperação, o desvio padrão relativo associado a cada ensaio é tido em conta, não podendo exceder tipicamente os 25% no caso de parâmetros orgânicos na matriz água de consumo.

Capítulo 6. Materiais e Métodos

6.1 Equipamento e Material

- Cromatógrafo gasoso Agilent 6890N, com uma coluna Agilent J&W/ DB-VRX, 60 m x 0,32 mm x 1,80 μ m, acoplado a um espectômetro de massa, Agilent 5973N;
- *Software* para aquisição de dados, ChemStation MSD;
- Fibras para SPME, Supelco:
 - *Black* – CAR/PDMS 75 μ m;
 - *Green* – PDMS 7 μ m;
 - *Yellow* – PDMS 30 μ m;
 - *Red* – PDMS 100 μ m;
 - *White* – PA 85 μ m;
 - *Blue* – PDMS/DVB 65 μ m;
 - *Grey* – DVB/CAR/PDMS 30/50 μ m;
- Sistema de água ultra pura, Mili Q, Milipore;
- Pipeta automática e pontas de plástico, Finnpiptette;
- Seringas de vidro de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 μ L, da Agilent;
- Pipetas de Pasteur, Normax;
- Vials de vidro de 20 mL, Gerstel;
- Cápsulas magnéticas com septo de borracha natural/PTFE para vials de 20 mL, Gerstel;
- Capsulador;
- Balança analítica, Mettler Toledo XS204;
- Vortex, MS3 Digital IKA;
- Balões de vidro de 10, 50 e 100 mL Hirschmann;
- Métodos de aquisição no MS:
 - *Full Scan* - VOCFSPEDRO;
 - *SIM* – VOCSIMPEDRO.

6.2 Reagentes

6.2.1 Padrões Certificados

- Benzeno, 99,5%, C₆H₆, CAS:71-43-2, Chem Service;
- Tolueno, 99,8%, C₇H₈, CAS:108-88-3, Carlo Erba Reagents;
- Etilbenzeno, 99,5%, C₈H₁₀, CAS:100-41-4, Chem Service;

- m-Xileno, 99,5%, C_8H_{10} , CAS:108-38-3, Chem Service;
- p-Xileno, 99,5%, C_8H_{10} , CAS:106-42-3, Chem Service;
- o-Xileno, 99,2%, C_8H_{10} , CAS:95-47-6, Chem Service.

6.2.2 Solventes

- Águas engarrafadas Carvalhelhos, Evian e Vitalis;
- Água ultra pura;
- Água desmineralizada;
- Metanol, 99,9%, CH_3OH , CAS:67-56-1, Carlo Erba Reagents;
- Cloreto de Sódio, 99,5%, NaCl, CAS:7647-14-5, Merck.

6.2.3 Amostras

- Água destinada ao consumo humano proveniente da rede de distribuição da EPAL;
- Água superficial da Captação de Castelo de Bode (Rio Zêzere);
- Água superficial da Captação da Valada do Ribatejo (Rio Tejo);
- Água subterrânea de furos das Lezírias.

6.3 Procedimento Experimental

6.3.1 Preparação das Soluções de Trabalho (Padrão)

A preparação das soluções padrão mãe individuais e as soluções intermédias conjuntas foram efetuadas usando como solvente o metanol e mantidas conservadas por refrigeração a 5 ± 3 °C. As soluções padrão de trabalho foram preparadas no momento de cada análise, em água ultrapura.

O procedimento efetuado na preparação das soluções padrão, para a validação do método cromatográfico, foi o seguinte:

Solução padrão individual: como os padrões certificados se encontravam todos em solução, o modo de preparação foi idêntico para todos. Num balão volumétrico de 100 mL, foi adicionado metanol, solvente, quase até ao traço de aferição, deixando espaço suficiente para a adição do padrão individual na concentração desejada. Com auxílio das seringas de vidro, retirou-se a quantidade pretendida de padrão e adicionou-se ao balão volumétrico, mergulhando a ponta da seringa no solvente para evitar perdas, dada a característica volátil dos compostos em estudo. Afere-se o balão até ao traço com metanol.

A Tabela 6.1 sumariza a concentração de padrão na solução individual.

Tabela 6.1 – Concentração das soluções padrão individuais preparadas

Compostos	Solução Padrão Individual
	(mg/L)
Benzeno	871,62
Tolueno	863,27
Etilbenzeno	861,67
m-xileno	856,70
p-xileno	856,70
o-xileno	872,96

Solução padrão conjunta intermédia 1

Num balão de 50 mL, foi adicionado metanol, como solvente, quase até ao traço de aferição, deixando espaço suficiente para a adição das soluções padrão individuais. Foram adicionados no balão de 50 mL, 400 µL individualmente de benzeno e tolueno, 150 µL de etilbenzeno, 140 µL individualmente de m-xileno e p-xileno e 280 µL de o-xileno. Com o cuidado novamente de mergulhar a ponta da seringa no solvente, de forma a evitar perdas e no final aferiu-se com metanol até ao traço.

Solução padrão conjunta intermédia 2

Num balão de 10 mL, foi adicionado mais uma vez metanol, quase até ao traço de aferição, assegurando o espaço necessário para a adição da solução padrão conjunta 1. Foram medidos e adicionados 250 µL da solução padrão conjunta, mais uma vez, com o cuidado de mergulhar a ponta da seringa no solvente e por fim aferiu-se com metanol até ao traço.

As concentrações dos compostos na solução padrão conjunta 1 e 2 encontram-se em detalhe na Tabela 6.2:

Tabela 6.2 – Concentração da solução padrão conjunta intermédia 1 e 2 preparada

Compostos	Sol. Padrão conjunta intermédia 1	Sol. Padrão conjunta intermédia 2
	(mg/L)	(µg/L)
Benzeno	6,97	174,32
Tolueno	6,91	172,65
Etilbenzeno	2,59	64,63
m-xileno	2,40	59,97
p-xileno	2,40	59,97
o-xileno	4,89	122,21

Soluções padrão de trabalho: A 16 *vials* de 20 mL contendo 15 mL de água ultra pura, foram adicionados diferentes volumes, da solução padrão conjunta intermédia 2, com recurso a seringas, tendo o cuidado de mergulhar a ponta da seringa, aquando da adição, no solvente.

Daqui para a frente, considera-se que o m-xileno e p-xileno são um único composto, ou seja, a concentração adicionada de cada um dos dois compostos na preparação da solução padrão conjunta é somada, considerando como um único composto, dado que possuem o mesmo tempo de retenção.

A Tabela 6.3 apresenta os diferentes volumes e concentrações das soluções padrão de trabalho:

Tabela 6.3 – Volumes e concentrações das soluções dos padrões de trabalho

Padrões	Volume		Concentração			
	Adicionado ao vial (μL)		(μg/L)			
			Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	m-, p-xileno o-xileno
P1	25		0,29	0,29	0,11	0,20 0,20
P2	30		0,35	0,35	0,13	0,24 0,24
P3	45		0,52	0,52	0,19	0,36 0,37
P4	60		0,70	0,69	0,26	0,48 0,49
P5	80		0,93	0,92	0,34	0,64 0,65
P6	90		1,05	1,04	0,39	0,72 0,73
P7	105		1,22	1,21	0,45	0,84 0,86
P8	120		1,39	1,38	0,52	0,96 0,98
P9	140		1,63	1,61	0,60	1,12 1,14
P10	160		1,86	1,84	0,69	1,28 1,30
P11	175		2,03	2,01	0,75	1,40 1,43
P12	190		2,21	2,19	0,82	1,52 1,55
P13	210		2,44	2,42	0,90	1,68 1,71
P14	225		2,61	2,59	0,97	1,80 1,83
P15	240		2,79	2,76	1,03	1,92 1,96
P16	260		3,02	2,99	1,12	2,08 2,12

6.3.2 Condições de otimização de SPME

Já referida e detalhada na introdução, a técnica de SPME pode ser otimizada em vários parâmetros, como tal, a sua otimização incidiu, especificamente, sobre: o tipo de fibra a utilizar, o modo de extração, o tempo e a temperatura de extração, a temperatura de desadsorção, a

agitação da amostra e o *salting out*. As condições de extração e desadsorção ótimas obtidas, estão descritas na Tabela 6.4:

Tabela 6.4 – Condições de SPME ótimas obtidas

Pré-Incubação(min)	15
Tipo de fibra	PDMS/DVB
Tempo de adsorção (min)	4
Temperatura de adsorção (°C)	30
Tempo de desadsorção (min)	1
Agitação (rpm)	250
Modo de extração	<i>headspace</i>
Massa de NaCl	s/ NaCl

6.3.3 Condições do Método Cromatográfico

As condições relevantes ao método cromatográfico encontram-se nas Tabelas 6.5 a 6.12:

Tabela 6.5 – Condições do Injetor

Condições do Injetor	
Temperatura (°C)	200
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Tempo de <i>splitless</i> (min)	1

Tabela 6.6 – Condições da Coluna

Condições da Coluna	
Tipo de coluna	DB-VRX; 60 m x 320 µm x 1,80 µm
Gás de arraste/Fluxo (mL/min)	He/1,6

Tabela 6.7 – Condições Operacionais do forno para Full Scan.

Condições Operacionais do Forno- <i>Full Scan</i>		
Início		50 °C/ 4 min <i>hold</i>
Rampa 1	15°C/min	160 °C
Rampa 2	5°C/min	250 °C/ 5 min <i>hold</i>
Tempo total de análise		34,33 min

Tabela 6.8 – Condições Operacionais do forno para SIM

Condições Operacionais do Forno-SIM		
Início		50 °C
Rampa 1	15°C/min	160 °C
Rampa 2	5°C/min	200 °C/ 4 min
Tempo total de análise	19,33 min	

Tabela 6.9 – Condições da interface

Condições da interface	
Temperatura (°C)	250

Tabela 6.10 – Condições do detetor

Condições do detetor	
Tipo de detetor	Espéctrometro de massa
Temperatura da fonte (°C)	230
Temperatura do quadrupolo (°C)	150
Tipo de ionização	EI
Energia de ionização (eV)	70

Tabela 6.11 – Modo de pesquisa do MS

Modo	Intervalo Cromatográfico	m/z
	(min)	
<i>Full Scan</i>	3-35	50-450
SIM	3-7,1	77; 78
	7,1-19,33	91; 92; 105; 106

Tabela 6.12 – Iões de interesse escolhidos para modo SIM

Compostos	Iões de Quantificação (m/z)
Benzeno	77; 78
Tolueno	91; 92
Etilbenzeno	91; 106
Xilenos	91; 105; 106

Capítulo 7. Apresentação e Discussão de Resultados

7.1 Identificação dos Compostos em Estudo

Numa primeira fase no âmbito deste estudo, foi necessária a identificação dos compostos injetando individualmente cada um numa matriz de água ultrapura, de forma a determinar assim o seu tempo de retenção e o espectro de massa característico de cada composto.

Sabendo que o tempo de retenção não permite uma identificação inequívoca dos compostos, sendo necessário recorrer à espectrometria de massa de modo a obter total fiabilidade na identificação do composto a ser analisado foi usado para o GC/MS o modo de aquisição *Full Scan* que, como já supracitado, efetua um varrimento total dos iões obtidos por fragmentação das moléculas presentes na amostra, apresentando o tempo de retenção e o espectro de massa característico de cada composto. Através da análise dos espectros de massa foram escolhidos dois a três iões característicos de cada composto em função da sua abundância de modo a realizar, posteriormente, a análise em modo de aquisição SIM no espectrómetro de massa.

As Figuras 7.1, 7.2, 7.4 e 7.5 apresentam os espectros de massa obtidos correspondentes a cada composto em estudo e os seus iões característicos.

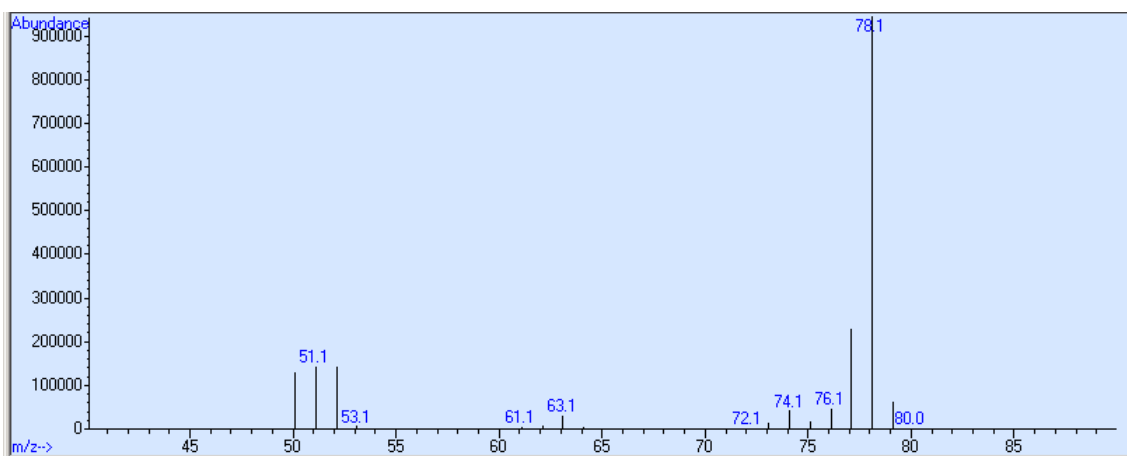


Figura 7.1 – Espectro de massa do composto Benzeno

Na observação do espectro de massa do benzeno, Figura 7.1, foram escolhidos como iões representativos os picos de maior intensidade e abundância correspondentes às razões m/z 77 e 78, não havendo possibilidade nem necessidade de escolher um outro pico devido ao facto de poder a vir a interferir com a identificação do composto.

Uma das características dos espectros de massa dos hidrocarbonetos aromáticos é a obtenção de iões moleculares bastante intensos, neste caso o ião de m/z 78, devido à sua grande estabilidade, onde dificilmente ocorrem reações de fragmentação posteriores.

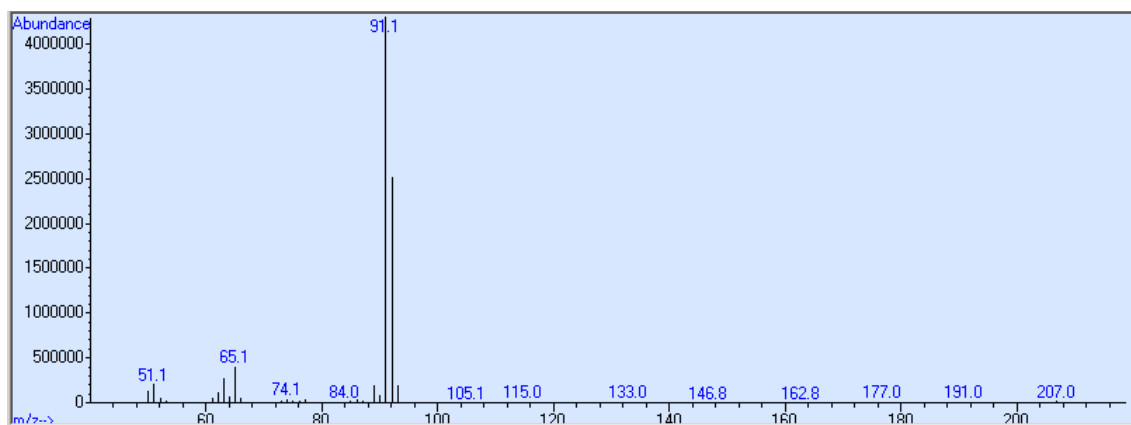


Figura 7.2 – Espectro de massa do composto Tolueno

Relativamente ao Tolueno, os picos selecionados foram os de razões m/z 91 e 92 pois apresentam uma maior intensidade. Novamente não se escolheu um terceiro pico devido à possibilidade de eventuais interferências na identificação do composto.

Na Figura 7.3 é apresentado um mecanismo possível de originar o ião característico selecionada com m/z de 91:

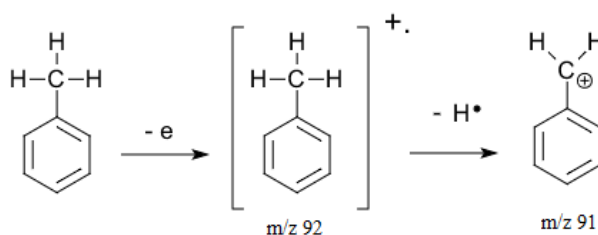


Figura 7.3 – Mecanismo de formação do ião característico m/z 91

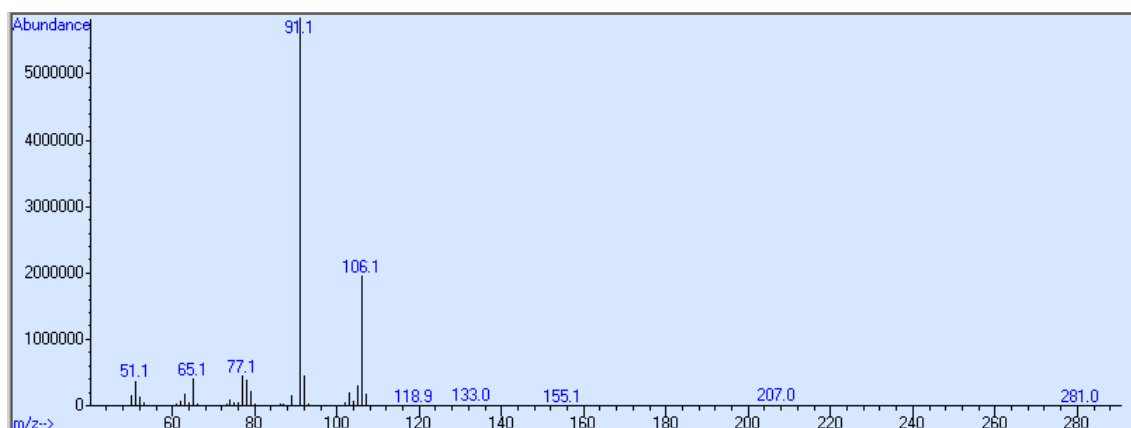


Figura 7.4 – Espectro de massa do composto Etilbenzeno

Através da análise do espectro de massa do Etilbenzeno os íons característicos selecionados para o modo de aquisição SIM foram os de razões de m/z de 91 e 106, novamente foram escolhidos pela elevada intensidade que estes picos possuem.

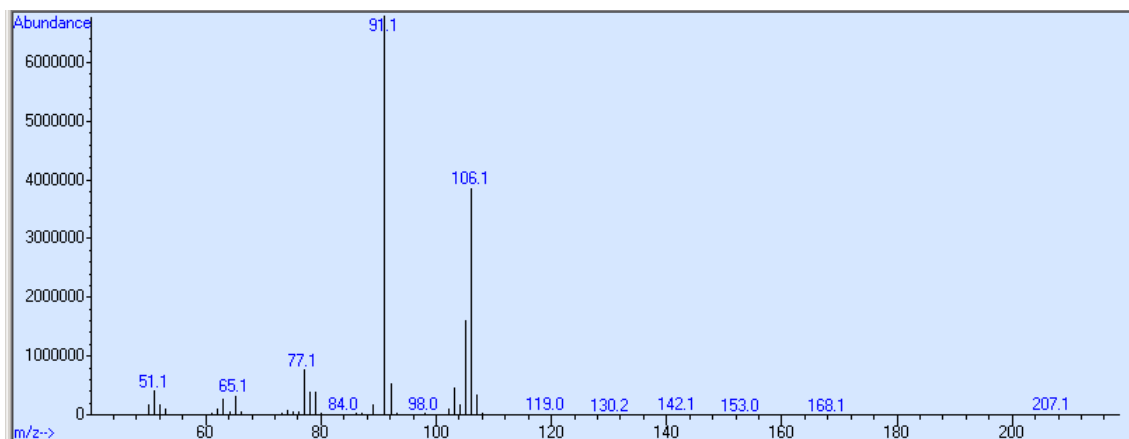


Figura 7.5 – Espectro de massa do composto Xileno

Na Figura 7.5, está representado o espectro de massa referente ao meta, para e orto-xileno, onde os íons característicos selecionados foram os correspondentes às razões de m/z de 91, 105 e 106. Apesar do espectro de massa ser o mesmo, o m-,p- xileno vão apresentar um tempo de retenção diferente do o-xileno, derivado do ponto de ebulição e da polaridade. Com base nas propriedades físico-químicas facultadas no Anexo II, o m-,p- xileno são mais voláteis apresentando um ponto de ebulição de 139°C e 138°C, respetivamente, tendo um tempo de retenção menor comparativamente ao o-xileno que possui um ponto de ebulição de 145 °C. Em relação à polaridade, os três compostos são apolares, mas apresentam momentos dipolares diferentes, enquanto que o p-xileno apresenta um momento dipolar nulo, o m-xileno apresenta um momento dipolar diferente de zero mas menor que o momento dipolar apresentado pelo o-xileno. Assim sendo, apesar da diferença de polaridade entre o meta e o para-xileno, esta não influência ao ponto de se obter tempos de retenção diferentes numa coluna cromatográfica de carácter apolar. O o-xileno possui um tempo de retenção superior devido ao seu maior ponto de ebulição.

Depois da obtenção dos íons individuais de cada um dos compostos, seguiu-se a análise conjunta dos seis compostos, designados por BTEX, em Full Scan para confirmação de separação dos compostos.

Por fim, foi realizada a análise em modo SIM recorrendo aos iões anteriormente escolhidos, cujo cromatograma se encontra representado na Figura 7.6.

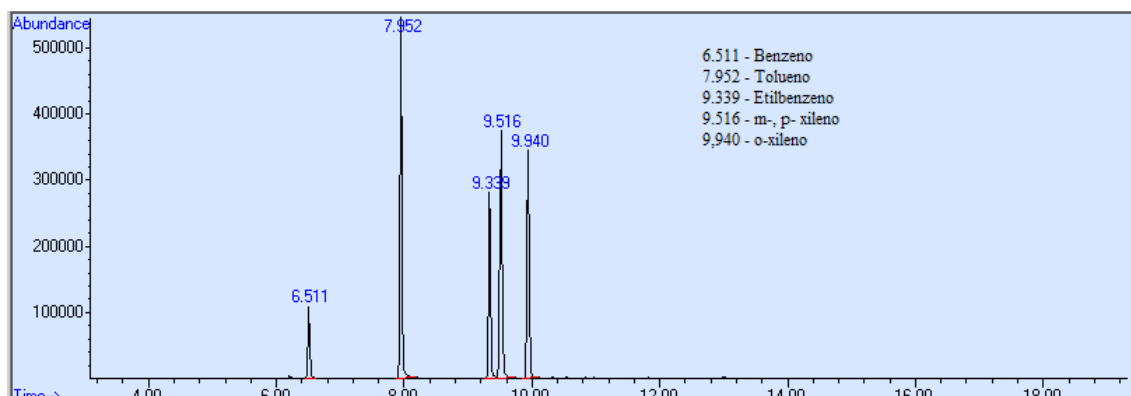


Figura 7.6 – Cromatograma da solução conjunta de BTEX

7.2 Otimização do método de preparação da amostra

De modo a estudar as condições ótimas para o equilíbrio de extração e adsorção dos compostos, entre outros, foram otimizados vários parâmetros do método de SPME. Os parâmetros de preparação da amostra alvo de estudo, incluem o tipo de fibra, o modo de extração, o tempo de extração, a temperatura de extração, o tempo de desadsorção, a aplicação de agitação ou não e adição de sais, *salting out*.

De salientar, o uso do modo SIM na otimização destes parâmetros, recolhendo os dados e comparando as áreas obtidas para cada composto, elegendo as condições mais favoráveis.

Para o início do estudo foram utilizadas as seguintes condições, apresentadas na Tabela 7.1, usadas já em rotina na EPAL para a análise de outros compostos orgânicos voláteis.

Tabela 7.1 – Condições iniciais utilizadas de SPME

Tipo de fibra	DVB/CAR/PDMS
Modo de extração	<i>Headspace</i>
Tempo de Extração (min)	4
Temperatura de extração (°C)	40
Tempo de Desadsorção (min)	4
Agitação (rpm)	Sem agitação
Massa de NaCl (g)	Sem NaCl
Tempo de <i>Splitless</i> (min)	2

7.2.1 Seleção do Tipo de Fibra

Para estudar o tipo de fibra que melhor extração proporciona dos compostos em estudo, foram analisadas várias soluções de água com a mesma concentração destes VOCs, mantendo as mesmas condições de ensaio, variando única e exclusivamente a fibra a ser utilizada. As fibras utilizadas neste estudo foram as seguintes: PDMS 7 μm , PDMS 30 μm , PDMS 100 μm , PA 85 μm , PDMS/DVB 65 μm , CAR/PDMS 75 μm e DVB/CAR/PDMS 30/50. Na Figura 7.7 apresentam-se os resultados obtidos:

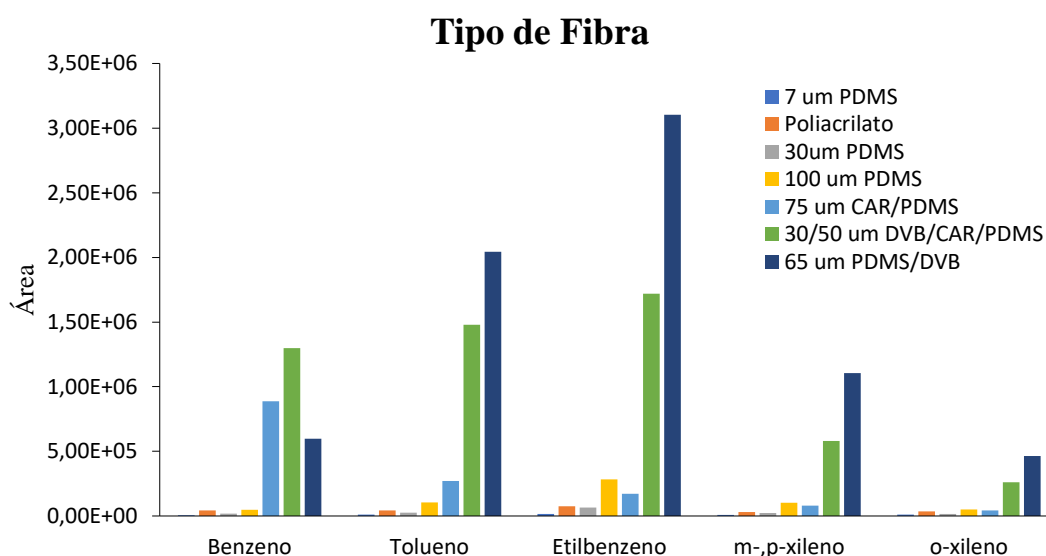


Figura 7.7 – Comparação entre fibras de SPME através da variação das áreas dos compostos em função do tipo de fibra

Pela análise da Figura 7.7 é possível observar que para o composto Benzeno a fibra mais adequada é a DVB/CAR/PDMS pois possui uma estrutura mais simples capaz de ser mais adsorvida por constituintes de carvão ativado presentes na fibra, enquanto que para os restantes compostos a mais promissora é a PDMS/DVB. A última fibra possui propriedades bipolares e é adequada para compostos voláteis, nos quais se inserem os compostos em estudo, com MM entre 50 a 300.

Deste modo, foi necessário optar pela fibra que apresentava uma maior sensibilidade no conjunto dos compostos a serem estudados, sendo essa a PDMS/DVB.

7.2.2 Modo de Extração

Neste parâmetro o estudo incidiu sobre a influência em realizar a extração por *headspace* ou por imersão direta. As condições operatórias mantiveram-se iguais, tal como as concentrações

dos compostos em estudo nas análises realizadas. Num *vial* de 20 mL, para o modo de extração por headspace foram utilizados 15 mL ao passo que para a imersão direta foram 18 mL.

Na Figura 7.8 encontram-se os resultados obtidos:

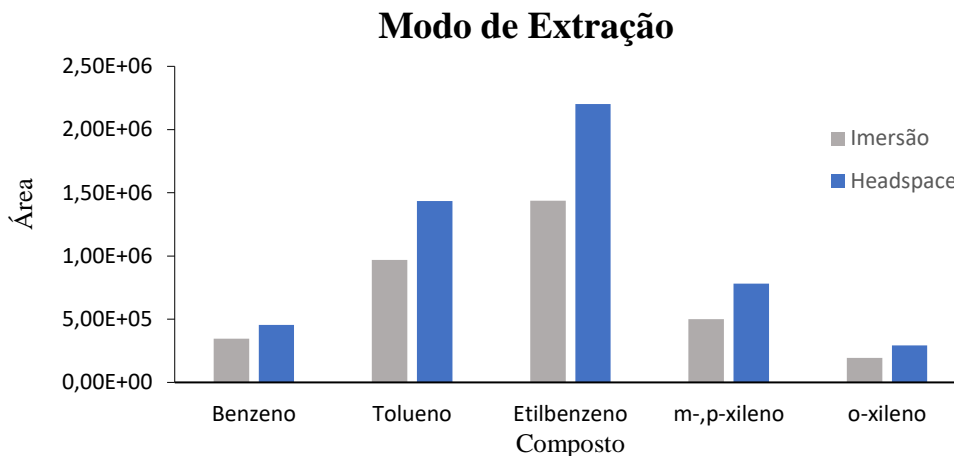


Figura 7.8 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função do modo de extração

Pela análise da Figura 7.8, verifica-se que o modo de extração que apresenta uma maior sensibilidade nas áreas dos compostos é por *headspace*, sendo desta forma o escolhido por apresentar uma maior eficácia na extração.

Os resultados obtidos permitiram confirmar que para compostos voláteis o modo de extração mais favorável é por *headspace*, tal como verificado.

7.2.3 Tempo de Extração

No estudo dos tempos de extração foram realizadas análises onde variou-se apenas o tempo de extração mantendo as mesmas condições de ensaio e concentração. Foi variado o tempo de adsorção entre 1 e 6 minutos, com aumento de 1 minuto para cada amostra. Os resultados que se obtiveram estão apresentados na Figura 7.9.

Analisando a Figura 7.9 conclui-se que o tempo de extração mais favorável para o estudo era 4 minutos. Nos compostos Etilbenzeno, m-,p-xileno e Tolueno verifica-se um aumento gradual da área relativa dos compostos entre 1 até aos 4 minutos, verificando-se um decréscimo a partir dos 4 minutos. No caso do Benzeno e do o-xileno é possível verificar pequenas variações das áreas ao longo do período estudado, observando um patamar de estabilização a partir dos 3 minutos.

A duração de tempos de extração pequenos deve-se ao baixo peso molecular dos compostos em estudo, para além possuírem pontos de ebulição baixos não havendo necessidade de tornar o processo mais longo.

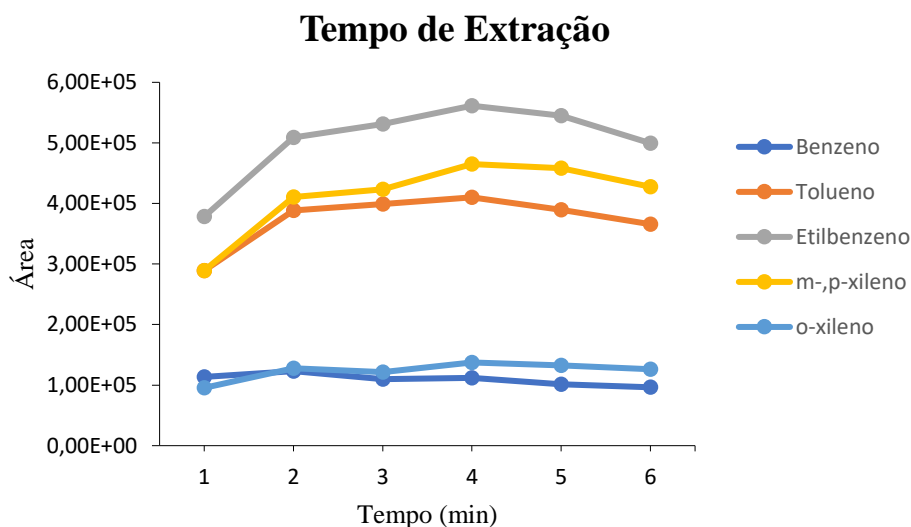


Figura 7.9 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função do tempo de extração

7.2.4 Temperatura de Extração

Para o estudo da temperatura de extração foram analisadas várias amostras variando unicamente a temperatura de extração através do forno onde ocorre a pré-incubação dos *vials*, mantendo a concentração e as condições operatórias. As temperaturas de extração analisadas realizaram-se entre os 30 e 60 °C, com incrementos de 5 °C. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7.10:

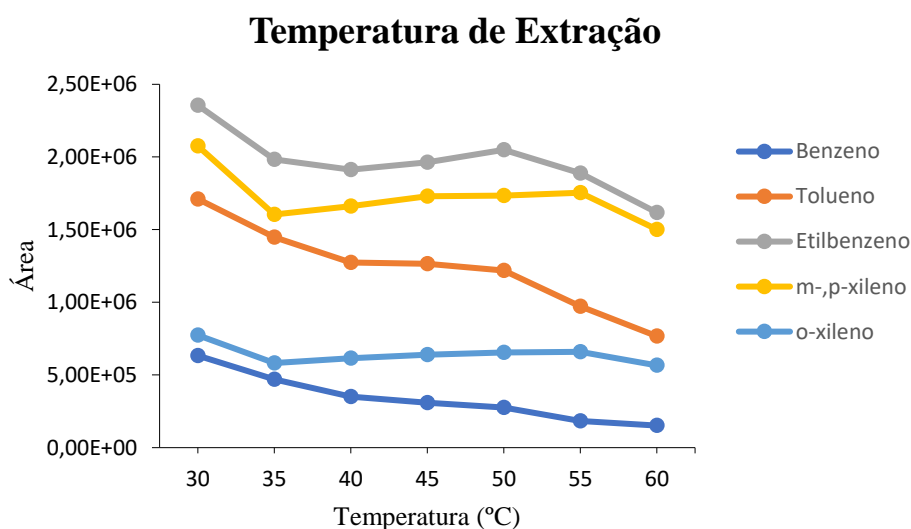


Figura 7.10 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função da temperatura de extração

Através da análise da Figura 7.10 é possível observar que a temperatura ideal de extração para o estudo é de 30 °C. É possível verificar-se um decréscimo das áreas entre os 30 e 35 °C por

parte de todos os compostos, onde no intervalo de temperaturas 40-50 °C as áreas mantêm-se quase inalteráveis, acabando por haver novamente um decréscimo das áreas a partir dos 55°C à excepção do Benzeno e o-xileno.

Os resultados obtidos são os expectáveis dada a volatilidade e o baixo peso molecular dos compostos, não havendo necessidade do uso de maiores temperaturas de extração como é observado. A diminuição da resposta com o aumento da temperatura poderá estar relacionada com a perda dos compostos do *vial* devido à sua volatilidade.

7.2.5 Tempo de Desadsorção

Na otimização do tempo de desadsorção foram realizadas várias análises mantendo a mesma concentração e condições operatórias, sendo variado apenas o tempo de desadsorção. Foram analisados os seguintes tempos: 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7.11:

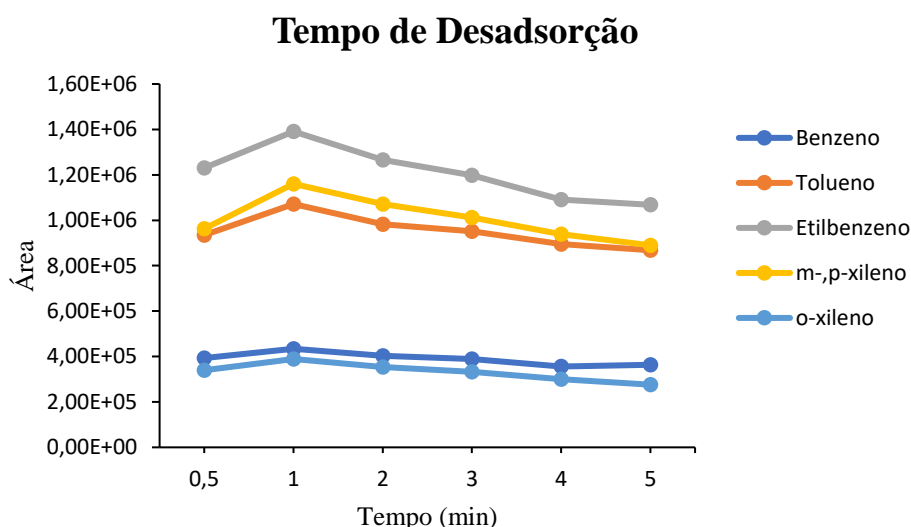


Figura 7.11 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função do tempo de desadsorção

Pela análise da Figura 7.11, conclui-se que o tempo de desadsorção correspondente a uma maior área obtida por parte de todos os compostos é 1 minuto.

É possível verificar que tanto o Benzeno como o o-xileno mantêm-se constantes ao longo do período escolhido para estudo, enquanto que para o Tolueno, Etilbenzeno e m-,p-xileno é atingida uma maior área ao 1 minuto seguindo-se um decréscimo gradual.

7.2.6 Agitação

O estudo deste parâmetro foi efetuado de modo a perceber a importância da agitação ou falta dela no pré-condicionamento do *vial*, como tal variou-se apenas a utilização ou não de agitação mantendo as mesmas concentrações dos compostos e condições de ensaio. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 7.12:

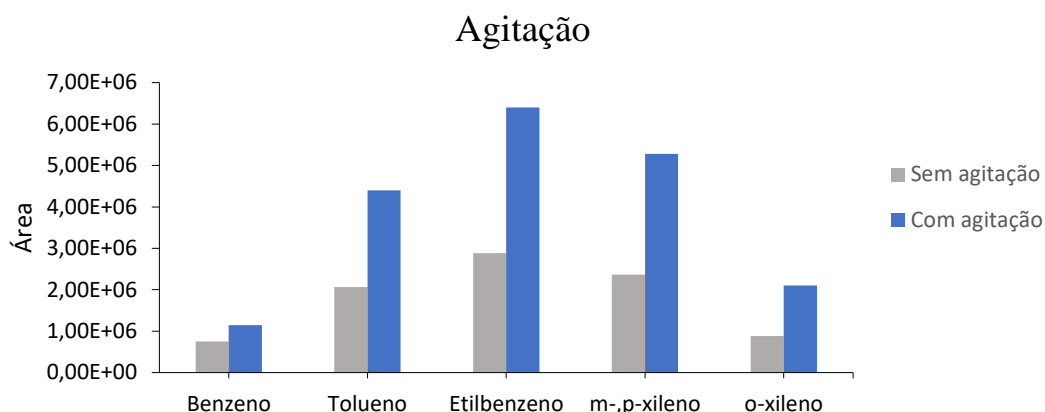


Figura 7.12 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função da agitação utilizada

Através da análise da Figura 7.12 é possível concluir que a utilização de agitação vai garantir uma maior eficiência da extração. Como já mencionado no Capítulo 2, há a necessidade de preservar a integridade na fibra ao assegurar o equilíbrio entre o aumento da eficiência da extração com a exequibilidade do método.

Desta forma, apenas se analisou uma agitação mais baixa de 250 rpm confirmando um aumento na eficiência da extração sem provocar danos na fibra prolongando-se essa garantia ao resto das análises a desempenhar.

7.2.7 Salting Out

Neste parâmetro foi testada a adição de sal, NaCl, verificando a existência de variações nas áreas obtidas. Nesse sentido, foram utilizados 1 e 2 g de NaCl mantendo as mesmas concentrações de analitos e condições experimentais. Para a dissolução de NaCl foi utilizado um ultra-sons e só depois realizou-se a fortificação da solução com os compostos de interesse. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 7.13:

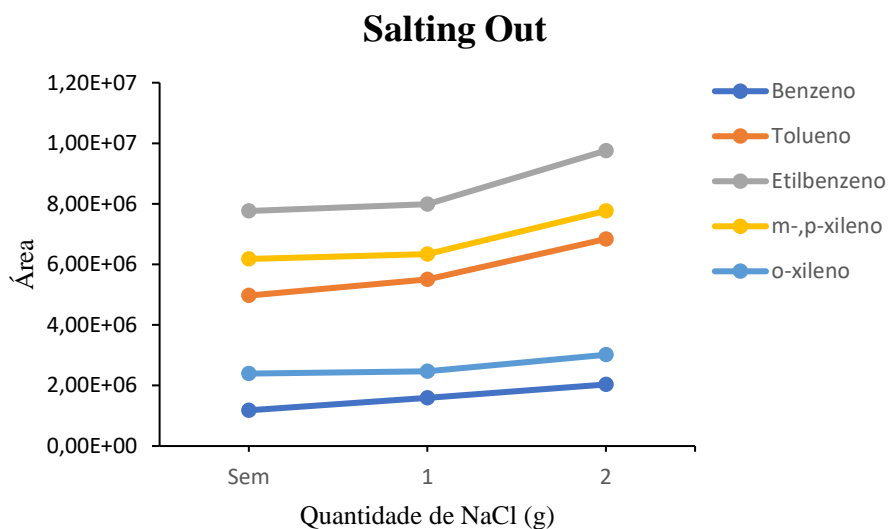


Figura 7.13 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função da quantidade de sal adicionado

De acordo com a Figura 7.13 é possível observar que para uma adição de 2g de NaCl existe uma maior sensibilidade, principalmente pelos analitos Etilbenzeno, m-,p-xileno e Tolueno. Como expectável, a adição de sal provoca um aumento da força iónica levando ao deslocamento dos analitos de interesse para o *headspace*.

Porém, nos resultados obtidos não se verifica um aumento extraordinário das áreas com o aumento da quantidade de NaCl, e portanto por questões de amostragem e praticabilidade do método optou-se por não se adicionar sal.

7.3 Otimização do Método Cromatográfico

Antes de se iniciar a validação do método cromatográfico em questão, foi revelante para o estudo otimizar outro parâmetro, o tempo de *Split/Splitless*.

7.3.1 Tempo de Split/Splitless

A otimização do tempo de Split/Splitless foi indispensável para observar o comportamento dos analitos de interesse através da variação das áreas e a existência de arrastamentos de picos pelo cromatograma. Como explicado no Capítulo 4, o injetor pode trabalhar no modo *Split* no qual a válvula de *Split* se encontra aberta (tempo correspondente a 0 minutos) e só uma pequena quantidade da amostra vai para coluna ou no modo *Splitless* em que a válvula permanece fechada durante e após a injeção abrindo-se para ventilar a câmara do injetor e levar consigo os resíduos de amostra ainda presentes, não alcançando a coluna. Foram analisados vários tempos de *Split/Splitless*: 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 4 sendo mantidas as concentrações dos analitos e condições operatórias. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 7.14:

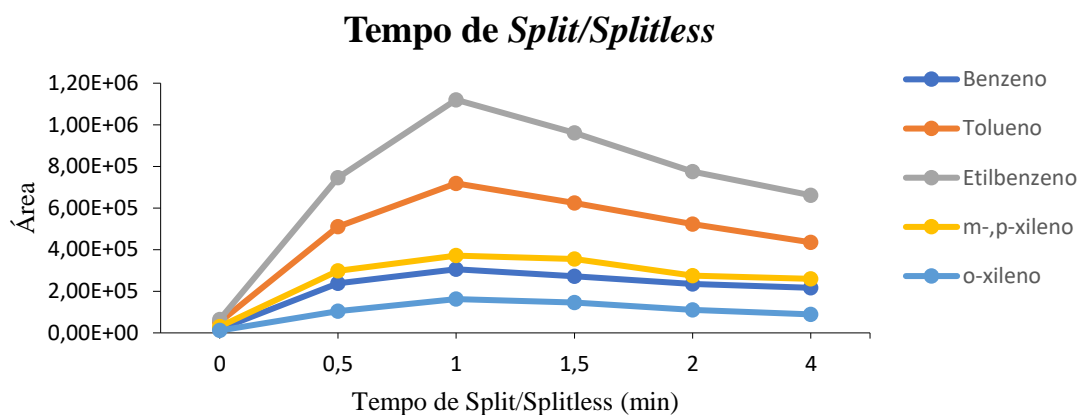


Figura 7.14 – Variação das áreas dos compostos em estudo em função do Tempo Split/Splitless

Analisando a Figura 7.14 é possível observar um aumento acentuado das áreas dos compostos até ao minuto 1, e posteriormente o decréscimo das áreas ao longo dos restantes tempos de *Split/Splitless* analisados.

Nesse sentido, o tempo de *Splitless* que garantiu uma maior área, ou seja, o correspondente ao valor de 1 min, foi o escolhido como sendo o ideal.

7.4 Validação do Método Cromatográfico

Após os estudos de optimização, ao nível da preparação da amostra por SPME e do método cromatográfico, seguiu-se a segunda parte envolvendo a validação do método cromatográfico, de modo a poder ser implementado em análises futuras.

Como tal foram utilizadas as 16 soluções padrão de trabalho a diferentes concentrações, que se encontram na Tabela 6.3, para o estudo de linearidade, usando a técnica SPME-GC/MS no modo SIM.

Para demonstrar que a gama de concentrações escolhida era linear, representou-se graficamente a área dos picos obtidos em função das concentrações, para cada composto com aplicação do método dos mínimos quadrados (Anexo III). Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 7.15 a 7.19:

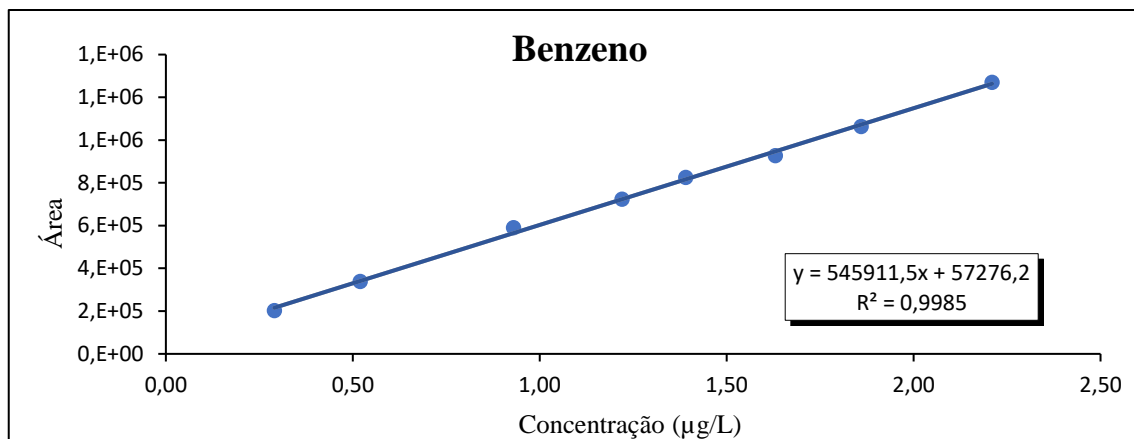


Figura 7.15 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o Benzeno

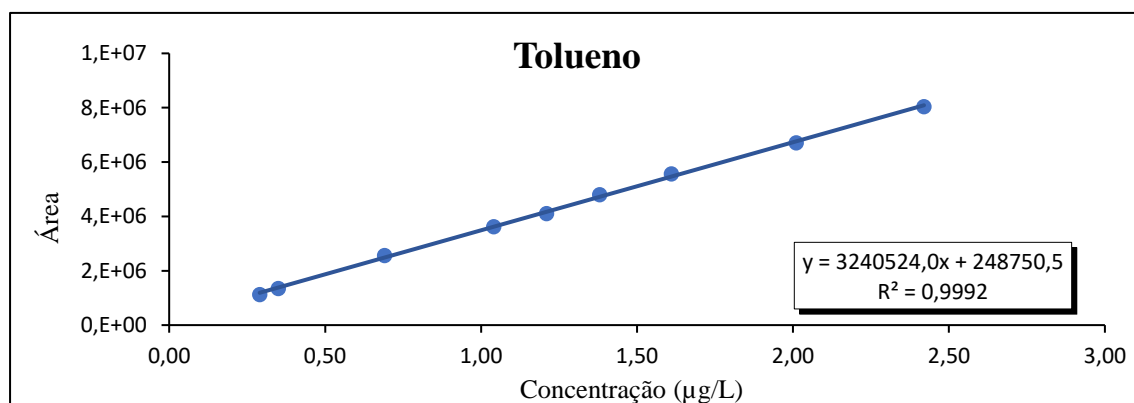


Figura 7.16 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o Tolueno

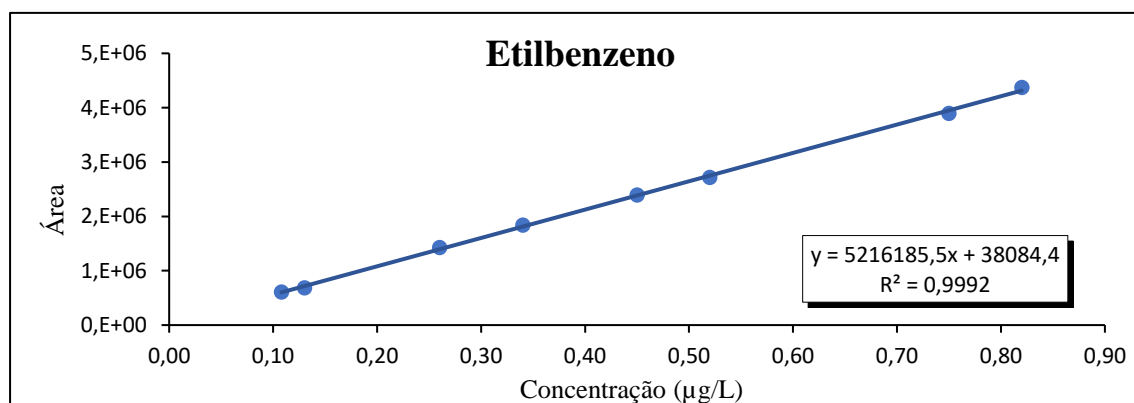


Figura 7.17 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o Etilbenzeno

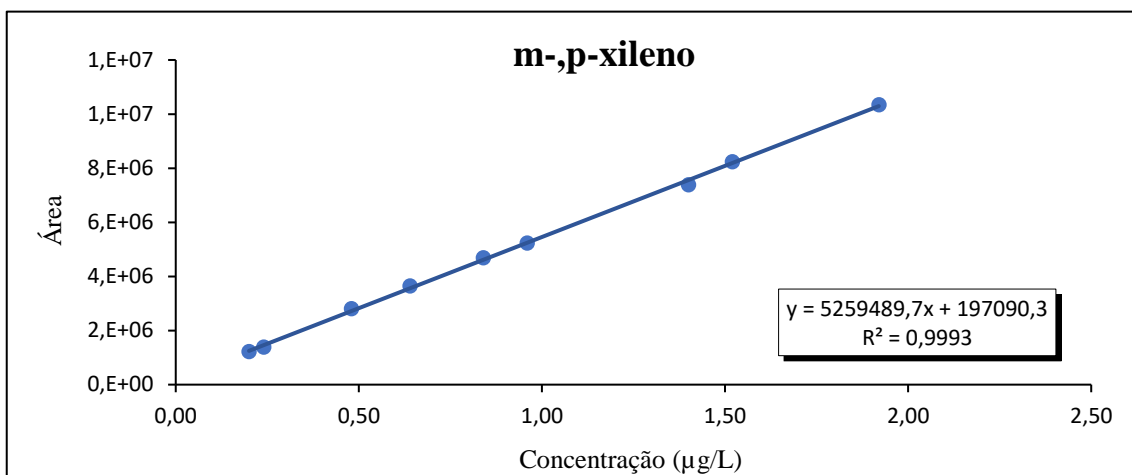


Figura 7.19 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o m-,p-xileno

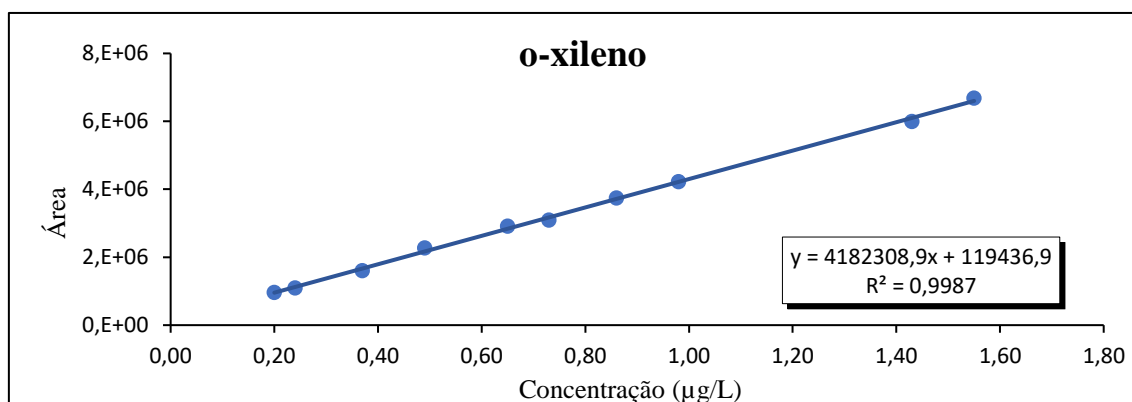


Figura 7.18 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o o-xileno

Os critérios necessários pelo método dos mínimos quadrados para confirmar a existência de linearidade da gama de trabalho assentam em alguns princípios. O primeiro é a distribuição equitativa dos pontos experimentais ao longo da gama de concentrações escolhida. Os outros dois não têm uma ordem específica, mas incidem sobre o coeficiente de correlação, r , que no mínimo deve apresentar um valor de 0,995 e o limite de quantificação, calculado a partir do desvio padrão residual da reta de calibração, que deve ser inferior à menor concentração da gama de trabalho.

No seguimento deste estudo foi também efetuado o teste de resíduos, onde uma distribuição aleatória dos pontos experimentais é indicativo que em princípio existe linearidade na gama de trabalho. Pelos resultados obtidos da Tabela 7.2 e com o acréscimo do teste de resíduos (Anexo III), é possível observar a existência de linearidade na gama de concentrações escolhida de todos os compostos analisados.

Ainda em complemento ao estudo da linearidade efetuou-se o teste de Mandel (Anexo IV), que confirmou um bom ajuste dos pontos experimentais, no facto do Valor de Teste ser inferior

ao $F_{\text{crítico}}$ (valor calculado em função dos graus de liberdade dos ajustes linear e polinomial), como demonstra a Tabela 7.3:

Tabela 7.2 – Resultados experimentais obtidos pelo método dos mínimos quadrados

Composto	Gama de linearidade ($\mu\text{g/L}$)	Coefficiente de Correlação	Limite de Quantificação ($\mu\text{g/L}$)
Benzeno	0,29-2,21	0,9992	0,28
Tolueno	0,29-2,42	0,9996	0,22
Etilbenzeno	0,11-0,82	0,9996	0,08
m-,p-xileno	0,20-1,92	0,9996	0,17
o-xileno	0,20-1,55	0,9993	0,18

Tabela 7.3 – Resultados obtidos pela aplicação do Teste de Mandel

Composto	Valor de Teste	$F_{\text{crítico}}$
Benzeno	0,48	5,59
Tolueno	3,52	5,59
Etilbenzeno	0,036	5,59
m-,p-xileno	0,041	5,59
o-xileno	0,025	5,59

Em ordem a realizar um estudo mais completo, efetuou-se o teste de Rikilt (Anexo V) que permite verificar se a quantificação pode ser feita com recurso ao fator de resposta. Com base nos resultados observa-se que se pode realizar a quantificação de todos os analitos através do fator de resposta. Todavia o valor obtido pelo Benzeno no primeiro padrão da gama de concentrações é de 115% excedendo em 5% o limite máximo (110%), porém foi considerado um valor desprezável cumprindo assim o Teste de Rikilt para todos os compostos.

No teste das áreas normalizadas os resultados foram semelhantes aos anteriores e novamente o Benzeno apresenta no primeiro padrão um valor da área normalizada de 84,7%, ou seja, inferior ao limite mínimo de 85%, contudo a diferença de 0,3% foi considerada desprezável e todos os compostos cumpriram os requisitos do teste. Importante de sublinhar, que caso não se pudesse quantificar a partir do fator de resposta o composto Benzeno, as soluções passíveis de se encontrar ocorriam de um aumento ou procura de uma outra gama de trabalho que cumprisse os critérios da existência de linearidade.

O último método realizado foi o teste de homogeneidade de variâncias (Anexo VII) para a definição da gama de trabalho. Verificou-se que em todos os compostos as diferenças entre as

variâncias do primeiro padrão (menor concentração) e o último padrão (maior concentração) eram significativas, ou seja, o valor de teste calculado, PG, é superior ao valor tabelado da distribuição de Fisher. A razão associada aos valores superiores de PG é fundamentada pela variabilidade presente na técnica de SPME. Não obstante, como ficou verificada a linearidade pelos outros testes estatísticos, as gamas de trabalho escolhidas foram aceites.

7.4.1 Limiares Analíticos

A determinação dos limites de deteção e quantificação teóricos (Anexo VIII) de cada composto foi efetuado com recurso a dois métodos diferentes, já detalhados no ponto 5.2.2.

O primeiro método foi efetuado com base nos estudos de repetibilidade, onde injetou-se dez vezes o padrão de calibração correspondente à concentração de gama mais baixa da gama de linearidade e calculou-se o respetivo desvio padrão. O segundo método consistiu no cálculo do desvio padrão residual da reta de calibração, para cada composto.

Na Tabela 7.4 estão sumarizados os limites de deteção e quantificação determinados para cada um dos compostos, pelos métodos utilizados.

Tabela 7.4 – Resultados obtidos de limite de deteção e quantificação pelos dois métodos

Composto	LOD ($\mu\text{g/L}$)		LOQ ($\mu\text{g/L}$)	
	Repetibilidade	Calibração	Repetibilidade	Calibração
Benzeno	0,06	0,08	0,17	0,28
Tolueno	0,07	0,07	0,21	0,22
Etilbenzeno	0,03	0,02	0,09	0,08
m-,p-xileno	0,05	0,05	0,16	0,17
o-xileno	0,06	0,05	0,17	0,18

Através da análise da Tabela 7.4, como seria de esperar, o LOQ calculado com base nos estudos de repetibilidade é inferior aos calculados com base na calibração.

Na legislação portuguesa, no DL 306/2007 de 27 de agosto é estipulado para o Benzeno que o método utilizado deve ser no mínimo capaz de medir a mesma concentração do valor paramétrico, neste caso $1 \mu\text{g/L}$, com um limite de deteção de 25%, ou seja de $0,25 \mu\text{g/L}$. Com base na Equação 5.1, o limite de quantificação do método de ensaio deve ser 75% do valor paramétrico, isto é, $0,75 \mu\text{g/L}$ para o Benzeno. Como verificado na Tabela 7.4 é cumprida essa especificação.

Ainda se efetuou a determinação dos limiares analíticos através razão sinal/ruído, S/N, mencionados no subcapítulo 5.2.2. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.5 e 7.6, para uma concentração vestigial e para a concentração mais baixa referente ao primeiro padrão da gama de trabalho, respetivamente.

Tabela 7.5 – Limiares analíticos determinados por razão S/N para concentração vestigial

Composto	Concentração (µg/L)	S/N (médio)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Benzeno	0,06	242	0,0008	0,002
Tolueno	0,06	830	0,0003	0,0008
Etilbenzeno	0,02	218	0,0003	0,001
m-,p-xileno	0,04	370	0,0004	0,001
o-xileno	0,04	297	0,0005	0,001

Tabela 7.6 – Limiares analíticos determinados por razão S/N para padrão mais baixo da gama de trabalho

Composto	Concentração (µg/L)	S/N (médio)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Benzeno	0,29	1353	0,0007	0,002
Tolueno	0,29	5909	0,0002	0,0005
Etilbenzeno	0,11	2503	0,0002	0,0005
m-,p-xileno	0,20	4016	0,0002	0,0005
o-xileno	0,20	3448	0,0002	0,0006

Pela análise das Tabelas 7.5 e 7.6 é possível confirmar que os valores obtidos para os limiares analíticos são significativamente mais baixos em comparação às duas metodologias anteriormente adotadas e nesse sentido seguem os requisitos presentes no DL 306/2007 de 27 de agosto, para o Benzeno, porém como já referido no subcapítulo 5.2.2, este método é pouco fiável e apresenta constantemente resultados desfasados da realidade.

7.4.2 Seleção da Matriz

O estudo de diferentes matrizes, tem como objetivo escolher a matriz mais adequada, ou seja, que não possua os compostos de interesse. Como tal, analisou-se os brancos (sem nenhuma fortificação) dos diferentes tipos de água, onde se inserem a água ultrapura, água desmineralizada, Carvalhelhos, Evian e Vitalis.

Pela observação dos resultados obtidos na Tabela 7.7 é possível verificar que os compostos presentes nos diferentes brancos são o Tolueno, Etilbenzeno e m-,p-xileno. Contudo, apesar da sua presença nas matrizes os valores observados são inferiores aos limites de deteção obtidos pelas duas metodologias utilizadas (Tabela 7.4), assim sendo não representam problema.

Tabela 7.7 – Resultados obtidos para as análises das diferentes matrizes

Matriz	Tolueno _{Branco} (µg/L)	Etilbenzeno _{Branco} (µg/L)	m-,p-xileno _{Branco} (µg/L)
Ultrapura	-	-	-
Desmineralizada	0,01	0,006	0,03
Carvalhelhos	0,05	-	0,02
Evian	0,006	-	-
Vitalis	0,006	-	0,02

De referir que a presença dos compostos na água desmineralizada pode estar associada a uma possível contaminação ambiental e que o estudo efetuado confirmou a escolha da água ultrapura como a matriz mais adequada procedente da sua viabilidade.

7.4.3 Sensibilidade do Método

Em consequência de todos os compostos em estudo satisfazerem a linearidade do método de calibração, a sensibilidade pode ser dada pelo declive das retas de calibração. A sensibilidade do método é representada graficamente pela Figura 7.20.

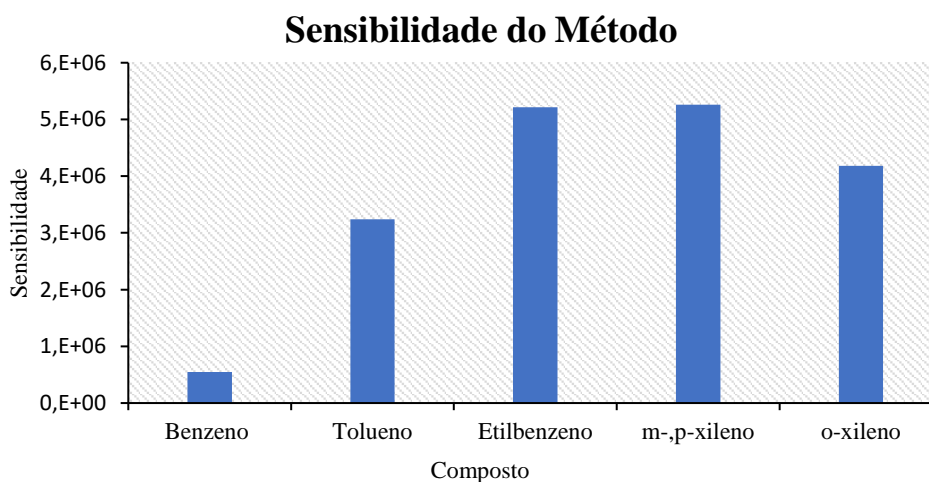


Figura 7.20 – Representação gráfica da sensibilidade do método para cada composto

Pela análise da Figura 7.20 verifica-se que tanto o Etilbenzeno como o m-,p-xileno apresentam uma maior sensibilidade sendo bastante superior à sensibilidade demonstrada pelo Benzeno. Uma superior sensibilidade do método significa uma maior aptidão para diferenciar entre diferentes concentrações. No entanto tem a particular de diminuir derivado à saturação do sinal, isto é, quando as concentrações são elevadas [59]. Pode-se então concluir que os resultados vão ao encontro dessa particularidade do parâmetro estudado, pois a gama de linearidade do Etilbenzeno e Xilenos é inferior aos restantes compostos.

7.4.4 Precisão

A precisão do método foi estudada em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, a 2 níveis de concentração dentro da gama de trabalho.

Repetibilidade

O estudo de repetibilidade foi realizado com dez ensaios efetuados no mesmo dia, para a mesma matriz, sob as mesmas condições operatórias e para duas concentrações diferentes já supracitadas, em condições de repetibilidade.

Para avaliar foram utilizados dois métodos: pelo desvio padrão relativo, RSD, como medida de qualidade e pelo limite de repetibilidade, r , por uma questão de congruência.

A Tabela 7.8 apresenta os resultados obtidos através das duas metodologias.

Tabela 7.8 – Repetibilidade para os dois níveis de concentração para $n=10$

Composto	Concentração Gama baixa ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	r	Concentração Gama alta ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	r
Benzeno	0,29	7,50	0,044	2,21	8,37	0,41
Tolueno	0,29	9,18	0,058	2,42	4,29	0,28
Etilbenzeno	0,11	12,7	0,026	0,82	15,2	0,34
m-,p-xileno	0,20	11,9	0,044	1,92	11,5	0,56
o-xileno	0,20	13,0	0,048	1,55	14,4	0,56

De acordo com a Diretiva 98/83/EC de 3 de novembro e pelo DL 306/2007 de 27 de agosto, a característica de desempenho dos métodos usados para compostos orgânicos no que respeita à precisão indica que o desvio padrão relativo, RSD, deve ser inferior a 25%. Ao analisar a Tabela 7.8 é possível observar que todos os compostos, para os dois níveis de concentração, apresentam um desvio padrão relativo inferior a 16% cumprindo assim os requisitos em relação à precisão do método, em condições de repetibilidade.

Precisão intermédia

Para avaliar a precisão intermédia foram realizados onze ensaios, correspondente à análise de uma amostra por dia, em 11 dias diferentes, em duas gamas de concentração diferentes (concentração mais baixa e mais alta da gama de trabalho), com a mesma matriz em condições de precisão intermédia. Calcularam-se os desvios padrão relativos, RSD, para os dois níveis de concentração estudados, estando representados na Tabela 7.9:

Tabela 7.9 – Precisão intermédia para os dois níveis de concentração

Composto	Concentração Gama baixa (µg/L)	RSD (%)	Concentração Gama alta (µg/L)	RSD (%)
Benzeno	0,29	10,8	2,21	14,8
Tolueno	0,29	12,6	2,42	16,9
Etilbenzeno	0,11	12,4	0,82	18,2
m-,p-xileno	0,20	12,3	1,92	18,2
o-xileno	0,20	11,3	1,55	21,8

Através da análise da Tabela 7.9, observa-se que todos os compostos apresentam um desvio padrão relativo inferior, RSD, inferior a 20% para as duas concentrações à exceção da concentração de gama alta do o-xileno que se encontra ligeiramente superior a esse valor, contudo é possível concluir que os resultados são satisfatórios pois encontram-se abaixo dos 25%.

Ao nível da importância do estudo da precisão, a repetibilidade tem uma preponderância maior que a precisão intermédia, pois tanto as análises das amostras e as respetivas calibrações não serão realizadas com um espaçamento tão díspar como o que foi efetuado durante este estudo.

7.4.5 Ensaios de Recuperação

Os ensaios de recuperação são importantes no estudo de validação de um método pois permitem avaliar o efeito da matriz na preparação e posterior análise das amostras, como já referido anteriormente no ponto 5.3.1. Para o estudo das recuperações foram analisadas quatro matrizes diferentes: água de consumo, água superficial do rio Tejo, água superficial do rio Zêzere (Albufeira de Castelo de Bode) e água subterrânea de um poço das Lezírias.

As percentagens de recuperação foram determinadas fortificando todas as matrizes com a mesma solução conjunta e novamente para dois extremos de concentração (gama mais baixa e gama mais alta da gama de trabalho) garantindo deste modo uniformidade de concentrações nas diferentes matrizes a analisar.

- **Análise de brancos**

No momento da análise dos ensaios de recuperação, efetuou-se juntamente um ensaio em branco com o objetivo de verificar a possibilidade de existência de interferentes, neste caso dos compostos de interesse, que pudessem alterar os resultados obtidos, de cada uma das matrizes. Foi detetado durante os ensaios da matriz de água subterrânea, especificamente no branco, o composto Tolueno com uma concentração inferior ao limite de deteção, contudo com o intuito de obter resultados rigorosos foi subtraída essa concentração existente na matriz das amostras fortificadas.

No caso da matriz de água de consumo, sendo uma água tratada contendo Cloro foi adicionado tiosulfato de sódio, de modo a diminuir a existência e/ou formação de interferentes.

- **Determinação da percentagem de recuperação**

A percentagem de recuperação foi determinada com recurso à Equação 5.10, mencionada no Capítulo 5. Foi realizada a fortificação das diferentes matrizes (água de consumo, água subterrânea e as duas águas superficiais), com dois níveis diferentes de concentração e para n=6.

Os resultados obtidos para as quatro matrizes em estudo estão apresentados na Tabela 7.10 a Tabela 7.13.

Tabela 7.10 – Percentagens de recuperação obtidas na matriz de água de consumo humano para n=6

Composto	Concentração Gama baixa (µg/L)	Recup. (%)	RSD (%)	Concentração gama alta (µg/L)	Recup. (%)	RSD (%)
Benzeno	0,29	83,4	1,04	2,21	82,9	4,60
Tolueno	0,29	83,3	5,69	2,42	71,0	5,61
Etilbenzeno	0,11	74,2	5,24	0,82	92,1	13,6
m-,p-xileno	0,20	76,3	7,65	1,92	95,6	12,6
o-xileno	0,20	72,8	7,34	1,55	90,3	13,3

Tabela 7.11 – Percentagens de recuperação obtidas na matriz de água subterrânea, Poço das Lezírias, para n=6

Composto	Concentração Gama baixa (µg/L)	Recup. (%)	RSD (%)	Concentração gama alta (µg/L)	Recup. (%)	RSD (%)
Benzeno	0,29	101,4	11,7	2,21	98,2	5,76
Tolueno	0,29	92,9	9,81	2,42	84,3	1,19
Etilbenzeno	0,11	99,5	9,98	0,82	84,0	11,8
m-,p-xileno	0,20	79,2	8,98	1,92	91,2	8,05
o-xileno	0,20	97,0	10,6	1,55	91,1	14,9

Pela observação das Tabelas 7.10 e 7.11, pode-se concluir que as percentagens de recuperação obtidas são satisfatórias, apesar de haver alguma discrepância entre os dois extremos de concentração da gama de trabalho. Na matriz de água de consumo as percentagens de recuperação encontram-se entre 71 e 96%. No caso da matriz de água subterrânea as recuperações estão estimadas entre 84 e 101%.

Para ambas as matrizes o desvio padrão relativo é inferior ao limite máximo de 25%, indicado para a exatidão da análise de compostos orgânicos voláteis (Benzeno) no DL 306/2007 de 27 de agosto, relativo à água de consumo humano.

Tabela 7.12 – Percentagens de recuperação obtidas na matriz de água superficial, Tejo, para n=6

Composto	Concentração Gama baixa (µg/L)	Recup. (%)	RSD (%)	Concentração gama alta (µg/L)	Recup. (%)	RSD (%)
Benzeno	0,29	95,7	5,32	2,21	97,6	3,89
Tolueno	0,29	90,3	8,37	2,42	86,8	2,49
Etilbenzeno	0,11	83,9	10,3	0,82	91,9	8,09
m-,p-xileno	0,20	86,5	12,3	1,92	100,3	4,54
o-xileno	0,20	93,6	7,24	1,55	94,5	9,04

Tabela 7.13 – Percentagens de recuperação obtidas na matriz de água superficial, Rio Zêzere, para n=6

Composto	Concentração Gama baixa (µg/L)	Recup. (%)	RSD (%)	Concentração gama alta (µg/L)	Recup. (%)	RSD (%)
Benzeno	0,29	80,6	2,52	2,21	87,4	9,26
Tolueno	0,29	92,5	6,64	2,42	85,1	3,33
Etilbenzeno	0,11	70,2	5,80	0,82	99,4	10,6
m-,p-xileno	0,20	81,3	5,99	1,92	98,5	7,89
o-xileno	0,20	75,1	7,82	1,55	102,1	14,9

Relativamente às matrizes de água superficial observadas nas Tabelas 7.12 e 7.13 apresentam boas recuperações de 84-100% e 70-102%, para água superficial do Tejo e água superficial do Rio Zêzere, respetivamente. O desvio padrão relativo, RSD, para ambas as matrizes foi inferior ao valor indicativo de 25% para avaliar a exatidão do método.

Em suma, as percentagens de recuperação nas diferentes matrizes encontram-se num intervalo de 70 a 102% com um desvio padrão relativo inferior a 25% podendo verificar que são resultados aceitáveis.

Na Tabela 7.14 está o resultado obtido da percentagem de recuperação a nível global (as quatro matrizes e gamas de concentração) e o respetivo desvio padrão relativo, RSD.

Tabela 7.14 – Resultados obtidos de percentagem de recuperação global para cada um dos compostos

Composto	Recuperação _{Global} (%)	RSD _{Global} (%)
Benzeno	90,9	5,52
Tolueno	85,8	5,39
Etilbenzeno	86,9	9,43
m-,p-xileno	88,6	8,50
o-xileno	89,6	10,6

7.4.6 Incertezas

No estudo da incerteza do método foram consideradas três metodologias diferentes, como já referido ao pormenor no Anexo IX. A metodologia “passo a passo” inclui a incerteza padrão associada à interpolação da reta, u_{reta} , a incerteza padrão associada à preparação dos padrões, $u_{\text{padrão}}$ e a padrão incerteza associada à precisão intermédia, $u_{\text{prec int.}}$, consideradas no cálculo da incerteza combinada, u_c , seguida pela incerteza expandida, U .

A segunda e a terceira metodologia englobam a incerteza associada à precisão $u_{\text{precisão}}$, e a incerteza associada à exatidão, $u_{\text{exatidão}}$. A 2ª metodologia encontra-se baseada nos documentos VAM e OGC007(IPAC). A 3ª metodologia encontra-se baseada na ISO 11352 e no Guia Nordtest.

As Tabelas 7.15 a 7.17 representam as incertezas associadas a cada uma das metodologias utilizadas, assim como a incerteza combinada e expandida que advém de cada método adotado, para cada um dos BTEX.

Tabela 7.15 – Resultados obtidos para a incerteza do método pela metodologia “passo a passo”

Composto	u_{reta} (%)	$u_{\text{padrão}}$ (%)	$u_{\text{prec int.}}$ (%)	u_c (%)	U (%)
Benzeno	12	0,73	1,7	12	25
Tolueno	9,5	0,67	1,8	9,7	19
Etilbenzeno	8,4	0,75	2,6	8,8	17
m-,p-xileno	10	0,76	2,0	10	21
o-xileno	10	0,86	2,4	10	21

Tabela 7.16 – Resultados obtidos para a incerteza do método de acordo com VAM e OGC007 (IPAC)

Composto	$u_{\text{precisão}}$ (%)	$u_{\text{exatidão}}$ (%)	u_c (%)	U (%)
Benzeno	1,7	15	15	30
Tolueno	1,8	12	13	25
Etilbenzeno	2,6	15	16	31
m-,p-xileno	2,0	18	18	36
o-xileno	2,4	14	14	28

Tabela 7.17 – Resultados obtidos para a incerteza do método de acordo com ISO 11352 e Guia Nordtest

Composto	$u_{\text{precisão}}$ (%)	$u_{\text{exatidão}}$ (%)	u_c (%)	U (%)
Benzeno	1,7	1,9	2,6	5,1
Tolueno	1,8	1,9	2,6	5,2
Etilbenzeno	2,6	2,7	3,7	7,4
m-,p-xileno	2,0	2,1	2,9	5,9
o-xileno	2,4	2,6	3,6	7,1

De forma a compreender se os valores obtidos para incerteza expandida através das três metodologias para cada um dos compostos estava aceitável, foi necessário recorrer ao enquadramento legal. Na legislação portuguesa, atualmente, não está em vigor valores máximos da incerteza expandida para os compostos estudados, no entanto segundo o DL 83/2011 de 20 de junho, relativo a águas superficiais, a incerteza associada a uma medição tem de ser inferior a 50%, assim sendo pode-se ter este valor como referência e nesse caso os resultados são satisfatórios.

Para além desse valor de referência, ainda existe uma diretiva Europeia 2015/1787/EU de 6 de outubro, relativa à água de consumo, que apresenta valores máximos permitidos para a incerteza expandida, só que ainda não foi transposta para a legislação nacional.

Dos compostos em estudo só o Benzeno se encontra citado na diretiva, com 40% de valor máximo admitido para incerteza expandida, porém é possível usar ainda outro valor comparativo para compostos orgânicos como os PAH, com uma incerteza expandida em função do valor paramétrico máxima de 50% [60].

Nesse sentido observando as Tabelas 7.15 a 7.17, no qual as incertezas calculadas foram realizadas em função do primeiro padrão de concentração das gamas de linearidade, em particular o Benzeno encontrando-se abaixo da concentração máxima reconhecida na legislação nacional, e tomando 40% como o valor máximo permitido teoricamente é possível concluir que para ambas as metodologias aplicadas os resultados obtidos das incertezas expandidas foram aceitáveis.

Adicionalmente, através do estudo das incertezas e usando a incerteza expandida pelo método “passo a passo” foi possível expressar os resultados na gama de trabalho (gama mais baixa e gama mais alta de concentração), em termos de algarismos significativos. Na Tabela 7.18 observa-se a gama de trabalho para os extremos de concentração, com 1 algarismo significativo na incerteza da medição.

Tabela 7.18 – Expressão de resultados da gama de trabalho usando 1 algarismo significativo na incerteza da medição

Composto	Gama baixa (µg/L)	Gama alta (µg/L)
Benzeno	0,29 ± 0,07	2,2 ± 0,6
Tolueno	0,29 ± 0,06	2,4 ± 0,5
Etilbenzeno	0,11 ± 0,02	0,8 ± 0,1
m-,p-xileno	0,20 ± 0,04	1,9 ± 0,4
o-xileno	0,20 ± 0,04	1,6 ± 0,3

E ainda na Tabela 7.19 os resultados obtidos para a gama de trabalho estão expressos com 2 algarismos significativos na incerteza da medição.

Tabela 7.19 -Expressão de resultados da gama de trabalho usando 2 algarismos significativos na incerteza da medição

Composto	Gama baixa (µg/L)	Gama alta (µg/L)
Benzeno	0,290 ± 0,073	2,21 ± 0,56
Tolueno	0,290 ± 0,056	2,42 ± 0,47
Etilbenzeno	0,110 ± 0,019	0,82 ± 0,14
m-,p-xileno	0,200 ± 0,041	1,92 ± 0,39
o-xileno	0,200 ± 0,041	1,55 ± 0,32

Capítulo 8. Conclusões

A crescente necessidade e exigência de critérios em relação à qualidade da água leva ao desenvolvimento de metodologias capazes de detetar e quantificar compostos que se encontrem nas águas. Neste trabalho foi desenvolvido um método de validação que permitiu a análise de BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, m-,p-xileno, o-xileno) pelo método SPME-GC/MS.

Os resultados obtidos a partir desta metodologia permitem concluir que o método SPME-GC/MS é adequado para a realização de análises aos compostos estudados.

A realização do trabalho envolveu duas fases: a otimização do SPME e método cromatográfico e a segunda envolveu a validação do método. Na primeira fase, otimizaram-se vários parâmetros da técnica de microextração por fase sólida (SPME) com o objetivo de obter uma maior sensibilidade na resposta analítica dos compostos alvo. Na Tabela 8.1, estão apresentados os resultados que asseguraram a maior eficiência do método analítico, mesmo com conhecimento da variabilidade associada à técnica de SPME.

Tabela 8.1 – Resumo dos resultados obtidos da otimização de SPME e GC

Pré-Incubação(min)	15
Tipo de fibra	PDMS/DVB
Tempo de adsorção (min)	4
Temperatura de adsorção (°C)	30
Tempo de desadsorção (min)	1
Agitação (rpm)	250
Modo de extração	<i>headspace</i>
Massa de NaCl (g)	s/ NaCl
Tempo de <i>Splitless</i> (min)	1

A segunda parte do trabalho foi a validação do método, que incidiu sobre os estudos de linearidade, precisão, exatidão e incerteza global do método.

Os estudos de linearidade tiveram como base vários testes estatísticos com o objetivo de comprovar a linearidade e o método de quantificação passível de ser usado. O método dos mínimos quadrados foi o primeiro a ser efetuado e a confirmar a linearidade ao obter coeficientes de correlação superiores aos 0,995 para todos os compostos, no qual ainda foram calculados os limites de quantificação e deteção, como é possível observar pela Tabela 8.2.

Tabela 8.2 – Resumo dos resultados obtidos pelo método dos mínimos quadrados

Composto	Gama de linearidade (µg/L)	Coefficiente de Correlação	Limite de Detecção (µg/L)	Limite de Quantificação (µg/L)
Benzeno	0,29-2,21	0,9992	0,08	0,28
Tolueno	0,29-2,42	0,9996	0,07	0,22
Etilbenzeno	0,11-0,82	0,9996	0,02	0,08
m-,p-xileno	0,20-1,92	0,9996	0,05	0,17
o-xileno	0,20-1,55	0,9993	0,05	0,18

Os demais testes estatísticos realizados foram análise de resíduos, teste de Mandel, Rikilt, teste das áreas normalizadas que comprovaram a linearidade do método e ainda usar o fator de resposta como método de quantificação. Não se verificou a homogeneidade de variâncias entre o primeiro e último padrão da gama, mas os outros testes garantiram a existência de linearidade ao longo da gama de trabalho. Os resultados encontram-se na Tabela 8.3:

Tabela 8.3 – Resumo dos resultados obtidos efetuados pelos vários testes estatísticos

Composto	Mandel	Rikilt	Áreas Normalizadas	Homogeneidade de Variâncias
Benzeno	✓	✓	✓	-
Tolueno	✓	✓	✓	-
Etilbenzeno	✓	✓	✓	-
m-,p-xileno	✓	✓	✓	-
o-xileno	✓	✓	✓	-

Realizou-se ainda a determinação dos limiares analíticos por duas metodologias diferentes a partir dos estudos de repetibilidade e pelo desvio padrão residual da reta de calibração. Verificou-se que em ambos os casos os resultados obtidos estão de acordo com o especificado no DL 306/2007 de 27 de agosto, para o composto Benzeno (único composto que se encontra na legislação nacional) num limite de deteção inferior a 25% do valor paramétrico legislado de 1 µg/L.

Em relação aos estudos de precisão, precisão intermédia e repetibilidade a gama baixa e gama alta de concentração, o desvio padrão relativo foi sempre inferior aos 25%.

No estudo da exatidão, através dos ensaios de recuperação a quatro matrizes diferentes (água de consumo humano, duas águas superficiais e água subterrânea) em dois extremos de concentração (gama baixa e gama alta) os resultados foram satisfatórios com valores de 70 a

102% de percentagem de recuperação e desvio padrão relativo inferior a 25%. Globalmente, as percentagens de recuperação foram entre 85% e 91%.

Para completar a validação do método, determinaram-se as incertezas por duas metodologias diferentes e verificou-se que todos os compostos se encontram abaixo do limite proposto de 40%, estipulado na diretiva Europeia 2015/1787, relativa à água de consumo, para o Benzeno (considerado adicionalmente para os outros compostos), concluindo que os valores obtidos são satisfatórios. Em complemento, comparou-se também com o limite de 50% estipulado no DL 83/2011 de 20 de junho, para águas superficiais, confirmando os bons valores obtidos.

Em síntese, o trabalho realizado e os resultados obtidos permitem a implementação de um novo método analítico, dado que se cumpriu os requisitos necessários à validação de um método de ensaio. Contudo, pequenos melhoramentos podem ser realizados, como por exemplo, expandir a gama de linearidade do Benzeno, pois os valores obtidos para o primeiro padrão da gama de trabalho no teste de Rikilt e das Áreas Normalizadas, apesar de desprezáveis, distanciam-se um pouco dos limites impostos para os testes. Porém esses valores obtidos podem ter resultado da variabilidade associada à técnica de SPME. A partir da Figura 8.1 é possível observar outros fatores que podem ter influenciado os resultados obtidos.

Por fim, a título de proposta futura seria interessante estudar outro método de preparação de amostra, como o *Purge and Trap*, uma técnica muito utilizada com o GC/MS e com principal aplicabilidade na análise de compostos voláteis, VOCs. As duas técnicas de preparação, *P&T* e SPME, de amostra podiam ser comparadas ao longo do trabalho através da sensibilidade e eficiência de extração, como em condições de custo associadas ao seu desenvolvimento, acabando por escolher o método com condições mais favoráveis.

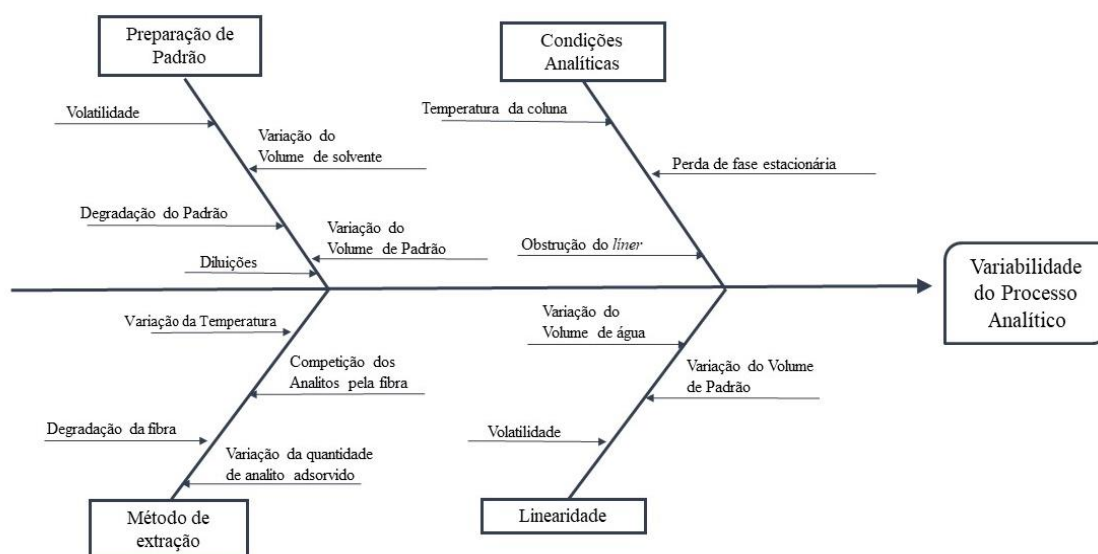


Figura 8.1 – Fatores possíveis para a variabilidade dos resultados obtidos

Referências Bibliográficas

- [1] P. K Goel, *Water Pollution: Causes, Effects and Control*. New Age International, 2006.
- [2] U.S. EPA, “The History of Drinking Water Treatment,” 2000.
- [3] U.S. EPA, “25 Years of the Safe Drinking Water Act: History and Trends,” 1999.
- [4] X. Chen *et al.*, “Simultaneous assessments of occurrence, ecological, human health, and organoleptic hazards for 77 VOCs in typical drinking water sources from 5 major river basins, China,” *Environ. Pollut.*, vol. 206, pp. 64–72, 2015.
- [5] R. E. Hester and R. M. Harrison, *Volatile Organic Compounds in the Atmosphere*. 1995.
- [6] E. R. Weiner, *Applications of Environmental Aquatic Chemistry - A practical guide*, 3rd ed. 2008.
- [7] S. A. B. Weelink, M. H. A. van Eekert, and A. J. M. Stams, “Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: Physiology and application,” *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, vol. 9, no. 4. pp. 359–385, 2010.
- [8] NHMRC (National Health and Medical Research Council), *Australian Drinking Water Guidelines* 6, no. March. 2011.
- [9] S. C. N. Queiroz, C. H. Collins, and I. C. S. F. Jardim, “Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica,” *Quim. Nova*, vol. 24, no. 1, pp. 68–76, 2001.
- [10] M. Meyer-Monath, J. Beaumont, I. Morel, F. Rouget, K. Tack, and F. Lestremau, “Analysis of BTEX and chlorinated solvents in meconium by headspace-solid-phase microextraction gas chromatography coupled with mass spectrometry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 18, pp. 4481–4490, 2014.
- [11] A. Sarafraz-Yazdi and H. Vatani, “A solid phase microextraction coating based on ionic liquid sol-gel technique for determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene in water samples using gas chromatography flame ionization detector,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1300, pp. 104–111, 2013.
- [12] WHO, *Guidelines for Drinking-Water Quality*, 4th ed. World Health Organization, 2011.
- [13] “EPAL- Empresa Portuguesa das Águas Livres, SA.” [Online]. Available: <http://www.epal.pt/EPAL/menu/epal>. [Accessed: 20-Jun-2017].
- [14] R. M. Smith, “Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1000, no. 1, pp. 3–27, 2003.
- [15] G. Vas and K. Vékey, “Solid-phase microextraction : A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis,” *Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.*, vol. 39, no. 3, pp. 233–254, 2004.
- [16] J. Pawliszyn, *Applications of Solid Phase Microextraction*. Royal Society of Chemistry, 1999.
- [17] A. L. Pires Valente and F. Augusto, “Microextração por fase sólida,” *Quim. Nova*, vol. 23, no. 4, pp. 523–530, 2000.
- [18] Supelco and Sigma-Aldrich, “Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions Solid,” 1998.
- [19] A. Trinh, “SPME - A Fast and Inexpensive Approach to Trace Organic Analysis,” *Report.*, vol. 19, no. 1, pp. 94–97, 2001.
- [20] S. Mitra and R. Brukh, *Sample Preparation: An Analytical Perspective*, vol. 162. 2003.
- [21] Pawliszyn, “Theory of solid-phase microextraction,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 38, no. 7, pp. 270–8, Jul. 2000.
- [22] J. Pawliszyn, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, 1st ed. Elsevier, 2012.
- [23] R. Shirey, “Selecting the appropriate SPME fiber coating - Effect of analyte molecular weight and polarity,” *The Reporter*, vol. 25.3. pp. 12–14, 2007.
- [24] S. Ulrich, “Solid-phase microextraction in biomedical analysis,” *Journal of Chromatography A*, vol. 902, no. 1. pp. 167–194, 2000.
- [25] Sigma-Aldrich, “Selection Guide for Supelco SPME Fibers,” *Sigma-Aldrich*, pp. 1–2, 2014.
- [26] D. Fiorini, D. Pacetti, R. Gabbianelli, S. Gabrielli, and R. Ballini, “A salting out system

- for improving the efficiency of the headspace solid-phase microextraction of short and medium chain free fatty acids,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1409, pp. 282–287, 2015.
- [27] H. McNair, “A History of Gas Chromatography: My Early Experiences,” 2010. [Online]. Available: <http://www.chromatographyonline.com/history-gas-chromatography-my-early-experiences>. [Accessed: 05-May-2017].
- [28] K. D. Bartle and P. Myers, “History of gas chromatography,” in *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 21, Elsevier, 2002, pp. 547–557.
- [29] W. Jennings, E. Mittlefehldt, and P. Strempel, *Analytical Gas Chromatography*, 2nd ed. Academic Press, 1997.
- [30] D. Rood, *A Practical Guide to the Care, Maintenance, and Troubleshooting of Capillary Gas Chromatographic Systems*, 3 edition. Wiley-VCH, 1999.
- [31] MicroSolv Technology Corporation, “Knowledge Base Home- Adjusted retention time,” 2013. [Online]. Available: <http://kb.mtc-usa.com/article/AA-01462/0/Adjusted-retention-time.html>.
- [32] W. Engewald and K. Dettmer-Wilde, “Chapter 2-Theory of Gas Chromatography,” in *Practical Gas Chromatography -A Comprehensive Reference*, 1st ed., Springer, 2014, pp. 21–57.
- [33] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 7th ed. W. H. Freeman and Company, 2007.
- [34] J. M. Miller, *Chromatography: Concepts and Contrasts*, 2nd ed. John Wiley & Sons Inc., 2005.
- [35] H. Hübschmann, *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*, 2nd ed. Wiley-VCH, 2009.
- [36] “Chromatography-Introductory theory,” *Sheffield Hallam University*. [Online]. Available: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/chrom1.htm>. [Accessed: 15-May-2017].
- [37] F. W. Karasek and R. E. Clement, *Basic gas chromatography-mass spectrometry: Principles and techniques.*, 1st ed. Elsevier, 1988.
- [38] Agilent Technologies, *GC Inlets- An Introduction*, 2nd ed. 2005.
- [39] “Gas Chromatography,” *Sheffield Hallam University*. [Online]. Available: <https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrom.htm>. [Accessed: 15-May-2017].
- [40] Chromacademy, “Optimising GC Temperature Programming.” p. 5, 2014.
- [41] “Agilent Technologies J&W Column Selection Principles.” [Online]. Available: http://www.crawfordscientific.com/Agilent_J_W_Selection_Principles.htm. [Accessed: 18-May-2017].
- [42] D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*. McGraw Hill, 2000.
- [43] H. Günzler and A. Williams, *Handbook of Analytical Techniques*, 1st ed. Wiley-VCH, 2001.
- [44] R. M. Smith, *Understanding Mass Spectra: A Basic Approach*, 2nd ed. John Wiley & Sons Inc., 2004.
- [45] E. Hoffmann and V. Stroobant, *Mass spectrometry- Principles and applications*, 3rd ed. John Wiley & Sons Inc., 2007.
- [46] J. Binkley, “Comparing the Capabilities of Time-of-Flight and Quadrupole Mass Spectrometers,” *Chromatogr. Online*, vol. 8, no. 3, pp. 28–33, 2010.
- [47] P. J. Gates, “Mass Spectrometry- Ion Detectors,” *University of Bristol*. [Online]. Available: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/detectors.xhtml>. [Accessed: 19-May-2017].
- [48] U. of B. Organic Geochemistry Unit (OGU), Bristol Biogeochemistry Research Centre School of Chemistry, “Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS),” *University of Bristol*, 2016. [Online]. Available: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/gcms.html>. [Accessed: 17-May-2017].
- [49] L. Huber, “Validation of Analytical Methods,” *Agilent Technologies*, p. 76, 2010.
- [50] Eurachem, “Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.,” 2014.
- [51] Relacre, *Guia Relacre 13-Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise*

- Química*, Relacre. 2000.
- [52] Waters, "A Guide to Analytical Method Validation," *Poster*, no. 6, 2006.
- [53] A. L. Huber and N. Buhay, "Validation of Analytical Methods and Procedures," 2012. [Online]. Available: <http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx>. [Accessed: 16-May-2017].
- [54] M. L. Wilde, K. Kümmerer, and A. F. Martins, "Multivariate optimization of analytical methodology and a first attempt to an environmental risk assessment of β -blockers in hospital wastewater," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 23, no. 9, pp. 1732–1740, 2012.
- [55] Greg Wells, Harry Prest, and Charles William Russ IV, "Why Use Signal-To-Noise As a Measure of MS Performance When It Is Often Meaningless?," *Agilent Technologies*, pp. 1–8, 2011.
- [56] C. Burgess, *Valid Analytical Methods And Procedures*. 2000.
- [57] A. Sofia and R. Mendes, "Implementação e Validação de Métodos Analíticos."
- [58] Relacre, *Guia Relacre 7- Ensaios Interlaboratoriais em Química*, Relacre. 1996.
- [59] A. D. and L. K. Desiré L. Massart, "Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures," in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, vol. 1, Elsevier Science Ltd, 1978.
- [60] European Commision, "DIRETIVA (UE) 2015/1787 da COMISSÃO de 6 de outubro de 2015," *J. Of. da União Eur.*
- [61] "Anexo 10-Teste de Mandel ou Teste de Fisher/Snedecor." [Online]. Available: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/27/20027_27_Anexos_10_Mandel.pdf. [Accessed: 12-Aug-2017].
- [62] "Anexo 9- Teste de RIKILT." [Online]. Available: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/26/20026_26_Anexos_9_RIKILT.pdf. [Accessed: 12-Aug-2017].
- [63] "Anexo 7- Teste das Áreas Normalizadas." [Online]. Available: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/24/20024_24_Anexos_7_ANormaliz.pdf. [Accessed: 12-Aug-2017].
- [64] B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, and M. Krysell, "Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories," *Nordtest*, p. 52, 2004.
- [65] ISO 11352, "Water Quality - Estimation of Measurement Uncertainty Based on Validation and Quality Control Data," 2012.
- [66] IPAC, "Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos," pp. 1–19, 2007.
- [67] S. R. L. Ellison and V. J. Barwick, "Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles," *VAM*, 2000.
- [68] "Anexo 12- Estimativa de Incertezas." [Online]. Available: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/29/20029_29_Anexos_12_Incert.pdf. [Accessed: 12-Aug-2017].
- [69] M. Rutkowska, K. Dubalska, G. Bajger-Nowak, P. Konieczka, and J. Namieśnik, "Organomercury Compounds in Environmental Samples: Emission Sources, Toxicity, Environmental Fate, and Determination," *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, no. 6, pp. 638–704, 2014.
- [70] J. V Hinshaw, "Solid-phase microextraction," *LC-GC Eur.*, vol. 16, no. 12, pp. 803–807, 2003.
- [71] Portal de Laboratórios Virtuais de Processos Químicos, "Processos de separação-Cromatografia." [Online]. Available: <http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=451>. [Accessed: 17-May-2017].
- [72] S. Wu, G. Lv, and R. Lou, "Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis," *Appl. Gas Chromatogr.*, p. 25, 2009.

Anexo I – Legislação

DECRETO-LEI N.º 306/2007 DE 27 DE AGOSTO

Visto e aprovado em Conselho de Ministros de 28 de Junho de 2007. – José Sócrates Carvalho Pinto de Sousa – João Titterington Gomes Cravinho – Francisco Carlos da Graça Nunes Correia – Manuel António Gomes de Almeida de Pinho – Jaime de Jesus Lopes Silva – Carmen Madalena da Costa Gomes e Cunha Pignatelli.

Promulgado em 4 de Agosto de 2007.

Publique-se.

O Presidente da República, Aníbal Cavaco Silva.

Referendado em 9 de Agosto de 2007.

Pelo Primeiro-Ministro, Fernando Teixeira dos Santos, Ministro de Estado e das Finanças.

ANEXO I

(a que se refere o n.º 1 do artigo 6.º)

Parâmetros e valores paramétricos

PARTE I

Parâmetros microbiológicos

1 – Os valores paramétricos para a água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição, por fontanários não ligados à rede de distribuição, por pontos de entrega, por camiões ou navios-cisterna, por reservatórios não ligados à rede de distribuição ou utilizada numa empresa da indústria alimentar são os seguintes:

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade	Observações
Acrilamida	0,10	µg/l	V. n. 1.
Antimónio	5,0	µg/l Sb	
Arsénio	10	µg/l As	
Benzeno	1,0	µg/l	
Benzo(a)pireno	0,010	µg/l	

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade
<i>Escherichia coli</i> (E.coli).	0	Número/100 ml.
Enterococos	0	Número/100 ml.

2 – Os valores paramétricos para as águas colocadas à venda em garrafas ou outros recipientes são os seguintes:

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade
<i>Escherichia coli</i> (E. coli).	0	Número/250 ml.
Enterococos	0	Número/250 ml.
<i>Pseudomona aeruginosa</i> .	0	Número/250 ml.
Número de colónias a 22°C.	100	Número/ml.
Número de colónias a 37°C.	20	Número/ml.

PARTE II

Parâmetros químicos

Os valores paramétricos para a água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição, por fontanários não ligados à rede de distribuição, por pontos de entrega, por camiões ou navios-cisterna, por reservatórios não ligados à rede de distribuição, utilizada numa empresa da indústria alimentar ou posta à venda em garrafas ou outros recipientes, são os seguintes:

Figura I.1 – Valor paramétrico imposto pela legislação para o Benzeno

Anexo II – Propriedades Físico-Químicas dos Compostos em Estudo

Tabela II.1 – Propriedades Físico-Químicas dos compostos em estudo

Composto	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	m-xileno	p-xileno	o-xileno
Fórmula Molecular	C ₆ H ₆	C ₇ H ₈	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀
Massa Molecular (g/mol)	78,1	92,1	106,2	106,2	106,2	106,2
Massa Específica (g/mL)	0,878	0,867	0,867	0,864	0,860	0,880
Ponto de Ebulição (°C)	80,1	110,8	136,2	139,0	138,4	144,4
Pressão de Vapor (kPa)	10,13	2,93	0,93	0,80	0,87	0,67
Solubilidade em água (mg/L)	1,78	515	152	200	198	175
Coefficiente de Partição (Log K_{oa})	2,13	2,65	3,20	3,20	3,18	2,95

Anexo III – Método dos Mínimos Quadrados e Análise de Resíduos

O estudo da linearidade da gama de concentrações, envolve inúmeros métodos e testes passíveis de se realizar de forma a garantir a sua validação. Para iniciar esse estudo aplica-se o método dos mínimos quadrados.

A forma algébrica de uma reta é expressa da seguinte maneira:

$$y = mx + b \quad (\text{Equação III. 1})$$

Onde m corresponde ao declive da reta e b à ordenada na origem.

A formação da reta é garantida por um conjunto de pares ordenados e independentes, $(x_1, y_1); \dots; (x_n, y_n)$ onde n corresponde ao número de pontos utilizados para a construção da reta. A variável x refere-se à concentração dos padrões utilizados e a variável y o sinal instrumental dado como resposta.

A partir do coeficiente de correlação, r, pode-se avaliar a fiabilidade da calibração analítica:

$$r = \frac{\sum\{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum(x_i - \bar{x})^2]\{\sum(y_i - \bar{y})^2\}}} \quad (\text{Equação III. 2})$$

O coeficiente de correlação pode admitir valores entre -1 e 1. Um valor de $r = -1$ é indicativo de uma correlação negativa e um valor de $r = 1$ é indicativo de uma correlação positiva. Se ainda se verificar que $r = 0$ é sinal de não existência de correlação entre as duas variáveis. Todavia, apesar da facilidade de determinação do coeficiente, há necessidade de comprovar a partir de outros testes a existência de linearidade, pois, um r próximo de 1 não garante necessariamente uma relação linear.

O cálculo dos coeficientes da reta de regressão é dado pelas seguintes equações:

$$m = \frac{\sum\{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum(x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Equação III. 3})$$

$$b = \bar{y} - m\bar{x} \quad (\text{Equação III. 4})$$

Onde x_i e y_i correspondem aos valores individuais de concentração na solução padrão e valores individuais do sinal instrumental, respetivamente. Já \bar{x} e \bar{y} correspondem aos valores médios dessas variáveis.

Os coeficientes m e b dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão do método. De modo a precisar essa estimativa, em termos quantitativos, recorre-se à determinação do desvio padrão residual, $S_{y/x}$:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum \{y_i - (b + mx_i)\}^2}{N - 2}} \quad (\text{Equação III. 5})$$

O desvio padrão residual exprime a dispersão dos valores da resposta analítica em torno da curva de calibração. O $S_{y/x}$ está ainda diretamente relacionado com os desvios padrão do declive, m , e da ordenada na origem, como representado nas seguintes equações:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação III. 6})$$

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \times \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação III. 7})$$

Podendo ser utilizados no cálculo dos limites de confiança dos dois coeficientes:

$$b \pm t \times S_b \qquad m \pm t \times S_m$$

Sendo t o valor da variável de t de *Student* para o nível de confiança esperado com $(N-2)$ graus de liberdade.

Posteriormente à determinação do declive e da ordenada na origem de uma reta, pode-se calcular a concentração de uma amostra por interpolação a partir da curva de calibração, como demonstrado pela seguinte equação:

$$x_i = \frac{y_i - b}{m} \quad (\text{Equação III. 8})$$

De importante utilidade para o analista, calcula-se o desvio padrão do método, S_m , pois permite a verificação da qualidade das análises efetuadas:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{m} \times 100 \quad (\text{Equação III. 9})$$

Complementarmente pode-se determinar o coeficiente de variação do método, CV_m , o qual permite comparar diferentes calibrações e métodos analíticos, expresso em percentagem:

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação III. 10})$$

- **Análise de Resíduos**

A análise de resíduos é efetuada após a determinação do declive da reta de calibração e da ordenada na origem. Inicialmente determinam-se as áreas de picos estimadas (y) com base na equação da reta, $y = mx + b$, onde as variáveis m, x e b são conhecidos. De seguida determina-se o quociente entre os picos obtidos experimentalmente e as áreas de picos estimadas. Por fim, determina-se os vários desvios (em percentagem) entre os valores observados e os esperados.

O propósito da realização de análise de resíduos é estudar e garantir a adequabilidade do modelo de regressão com base nos desvios/ resíduos. Ao representar graficamente (Figuras III.1 a III.5) os desvios em função das respetivas concentrações, é possível concluir quanto à linearidade do modelo que descreve os dados, sendo que a linearidade é verificada quando os pontos apresentam uma distribuição explicitamente aleatória [51].

- **Análise de Resíduos para Benzeno**

Tabela III.1 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o Benzeno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
215591	0,94	0,29	-5,8
341150	1,00	0,52	-0,4
564974	1,04	0,93	4,5
723288	1,00	1,22	0,0
816093	1,01	1,39	1,2
947112	0,98	1,63	-2,0
1072672	0,99	1,86	-0,8
1263741	1,01	2,21	0,5

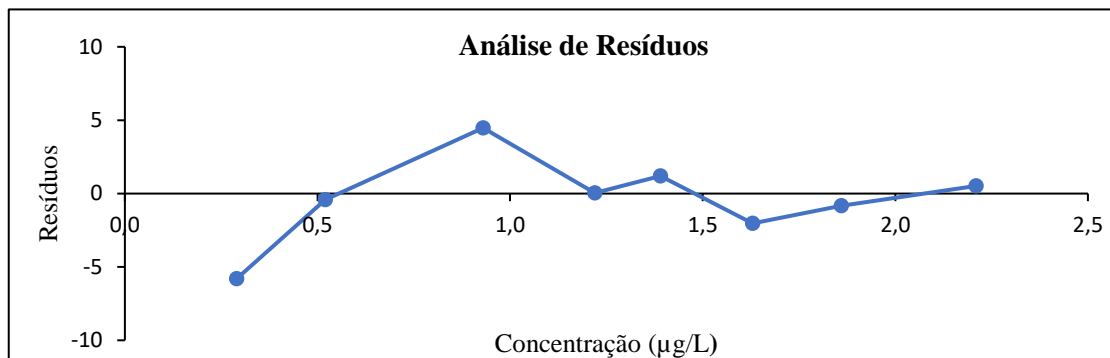


Figura III.1 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos para o Benzeno

- Análise de Resíduos para Tolueno**

Tabela III.2 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o Tolueno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
1188502	0,94	0,29	-5,7
1382934	0,98	0,35	-2,4
2484712	1,03	0,69	3,1
3618895	1,00	1,04	0,2
4169784	0,99	1,21	-1,4
4720674	1,02	1,38	1,8
5465994	1,02	1,61	1,8
6762204	0,99	2,01	-0,7
8090818	0,99	2,42	-0,6

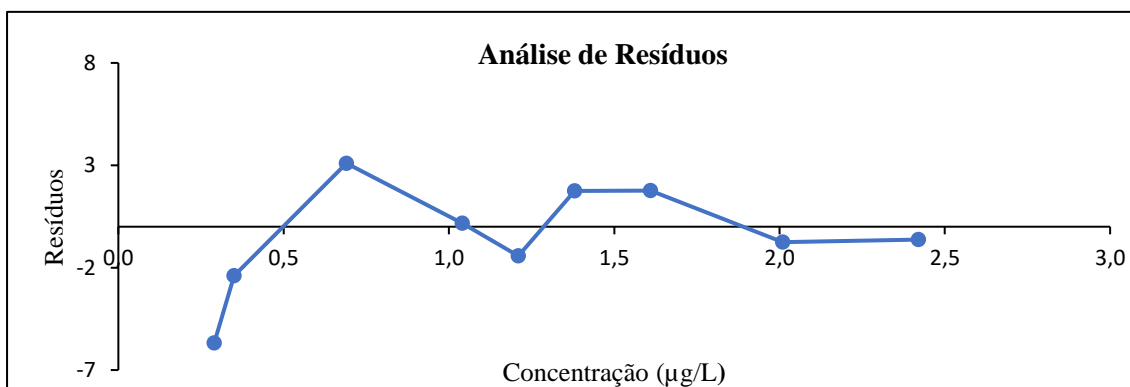


Figura III.2 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos para o Tolueno

- Análise de Resíduos para Etilbenzeno**

Tabela III.3 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o Etilbenzeno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
601432	1,01	0,11	0,8
716189	0,96	0,13	-4,4
1394293	1,02	0,26	2,4
1811587	1,01	0,34	1,4
2385368	1,00	0,45	0,2
2750501	0,99	0,52	-1,3
3950224	0,99	0,75	-1,5
4315357	1,01	0,82	1,3

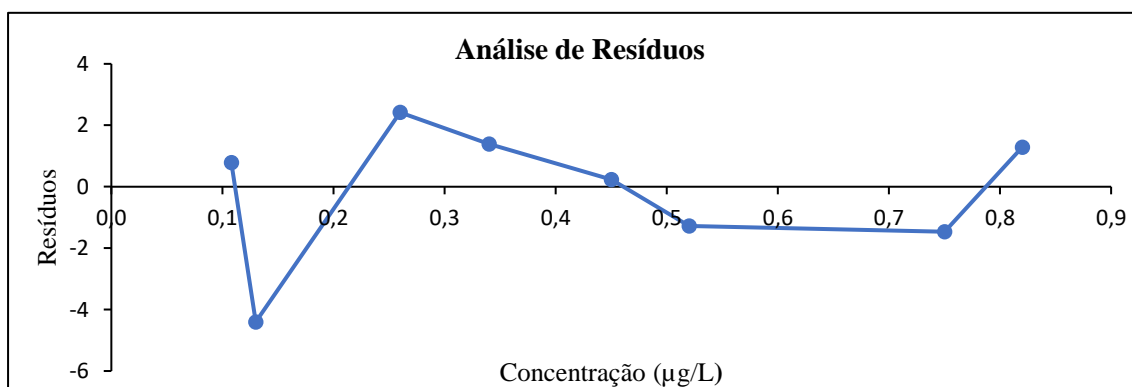


Figura III.3 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos para o Etilbenzeno

- Análise de Resíduos para m-,p-xileno**

Tabela III.4 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o m-,p-xileno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
1248988	0,97	0,20	-2,9
1459368	0,95	0,24	-5,0
2721645	1,03	0,48	2,7
3563164	1,02	0,64	2,1
4615062	1,01	0,84	1,4
5246200	1,00	0,96	-0,4
7560376	0,98	1,40	-2,3
8191515	1,01	1,52	0,6
10295310	1,00	1,92	0,4

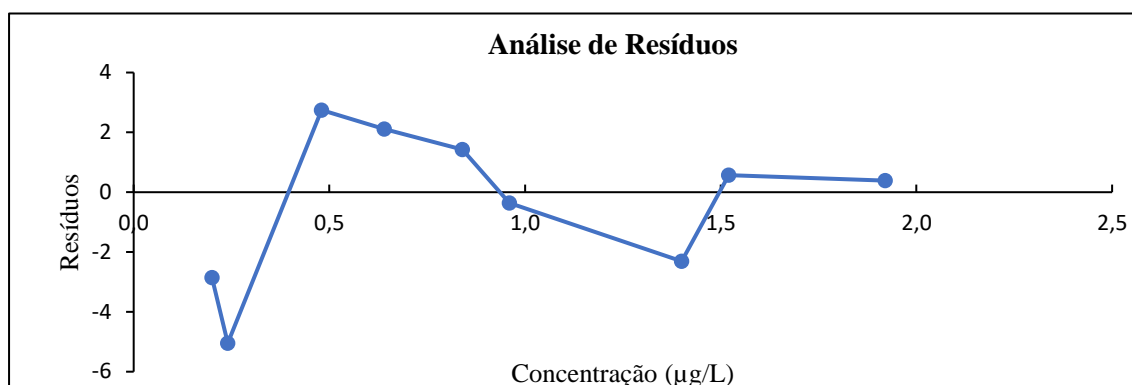


Figura III.4 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos para o m-p-xileno

- **Análise de Resíduos para o-xileno**

Tabela III.5 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o o-xileno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
955899	1,01	0,20	0,8
1123191	0,97	0,24	-2,8
1666891	0,96	0,37	-4,1
2168768	1,05	0,49	4,6
2837938	1,03	0,65	2,5
3172522	0,97	0,73	-2,6
3716223	1,01	0,86	0,8
4218100	1,00	0,98	0,1
6100139	0,98	1,43	-1,7
6602016	1,01	1,55	1,2

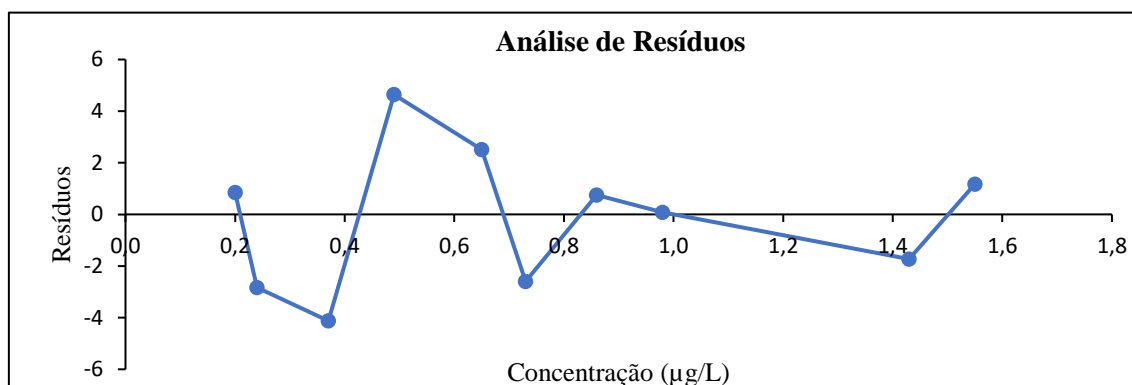


Figura III.5 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos para o o-xileno

Anexo IV – Teste de Mandel

De acordo com as normas ISO 8466-1 e 8466-2 é recomendado a utilização do modelo estatístico de Mandel para avaliar a linearidade. A partir dos resultados experimentais obtidos são calculadas as funções de calibração linear (ISO 8466-1) e polinomial (ISO 8466-2), bem como os respectivos desvios padrão residuais, $S_{y/x}$ e $S_{y/x(2^o)}$, através das seguintes equações:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - 2}} \quad (\text{Equação IV. 1})$$

$$S_{y/x(2^o)} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y}_{i(2^o)})^2}{N - 3}} \quad (\text{Equação IV. 2})$$

Em que N representa o número de padrões de calibração, y_i o sinal analítico obtido para um padrão de determinada concentração, \bar{y}_i e $\bar{y}_{i(2^o)}$ são os sinais estimados pelas duas funções de calibração, linear e polinomial, respetivamente.

Posteriormente é calculada a diferença de variâncias (DS^2) expressa pela seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y/x(2^o)}^2 \quad (\text{Equação IV. 3})$$

Por fim com relação com a diferença de variâncias calcula-se o valor teste, VT:

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y/x(2^o)}^2} \quad (\text{Equação IV. 4})$$

O valor de teste é comparado com os valores tabelados da distribuição de Fisher, considerando um nível de significância de 95%. Se $VT \leq F_{\text{critico}}$ a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos dados, e assim sendo, a função de calibração linear é que deve ser utilizada. Se $VT > F_{\text{critico}}$ a função de calibração é não linear, sendo necessário verificar-se a possibilidade de reduzir a gama de trabalho de modo a obedecer à primeira condição. Caso não seja possível, em último caso, utiliza-se a função de calibração polinomial [61].

• **Teste de Mandel para o Benzeno**

Tabela IV.1 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (Benzeno)

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
0,29	203070	215591	210942
0,52	339731	341150	340043
0,93	590241	564974	567713
1,22	723642	723288	726840
1,39	825782	816093	819387
1,63	927961	947112	949116
1,86	1063838	1072672	1072424
2,21	1270355	1263741	1258158

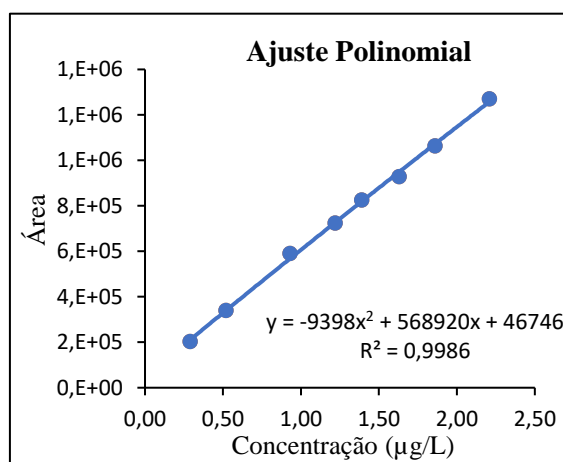
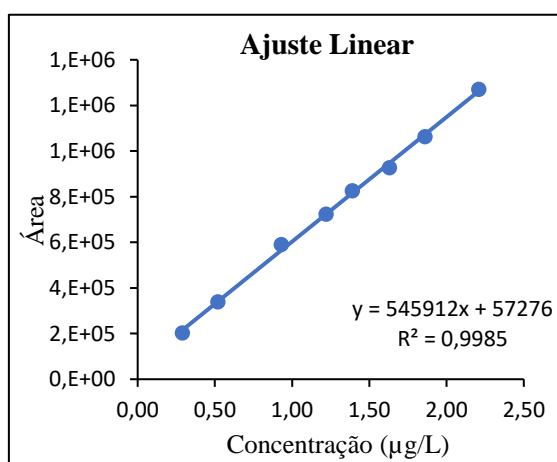


Figura IV.1 e IV.2 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (Benzeno)

Tabela IV.2 – Erros quadráticos para os dois ajustes (Benzeno)

	$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$
	1,57E+08		6,20E+07
	2,01E+06		9,77E+04
	6,38E+08		5,08E+08
	1,25E+05		1,02E+07
	9,39E+07		4,09E+07
	3,67E+08		4,48E+08
	7,80E+07		7,37E+07
	4,38E+07		1,49E+08
Soma =	1,38E+09	Soma =	1,29E+09
N-2 =	6	N-3 =	5
$S_{y/x} =$	1,52E+04	$S_{y/x(2^a)} =$	1,61E+04

$$DS^2 = (N - 2) S^2_{y/x} - (N - 3) S^2_{y/x(2^o)}$$

$$DS^2 = 8,90E+07$$

$$VT = DS^2 / S^2_{y/x(2^o)}$$

$$VT = 0,34$$

$$F_{(1,5)95\%} = 6,61$$

Como $VT < F$, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

- **Teste de Mandel para o Tolueno**

Tabela IV.3 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (Tolueno)

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
0,29	1120974	1188502	1144019
0,35	1349755	1382934	1347992
0,69	2561687	2484712	2492789
1,04	3624728	3618895	3651636
1,21	4110372	4169784	4207324
1,38	4803439	4720674	4758315
1,61	5562168	5465994	5496301
2,01	6711502	6762204	6759281
2,42	8039893	8090818	8026855

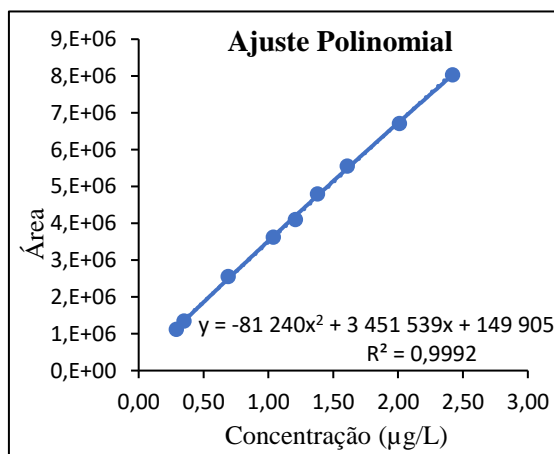
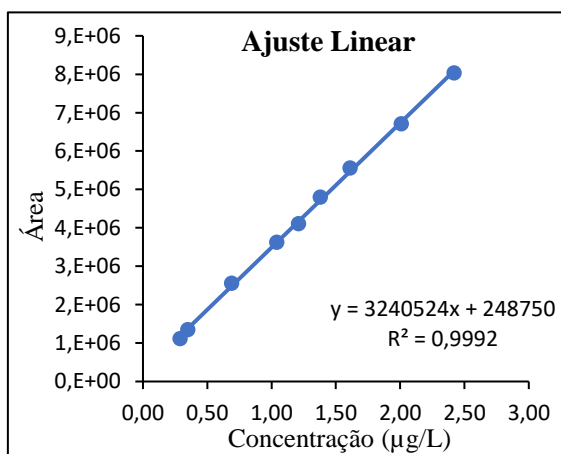


Figura IV.3 e IV.4 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (Tolueno)

Tabela IV. 4 – Erros quadráticos para os dois ajustes (Tolueno)

	$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$
	4,56E+09		5,31E+08
	1,10E+09		3,11E+06
	5,93E+09		4,75E+09
	3,40E+07		7,24E+08
	3,53E+09		9,40E+09
	6,85E+09		2,04E+09
	9,25E+09		4,34E+09
	2,57E+09		2,28E+09
	2,59E+09		1,70E+08
Soma =	3,64E+10	Soma =	2,42E+10
N-2 =	7	N-3 =	6
$S_{y/x} =$	1,52E+04	$S_{y/x(2^o)} =$	6,36E+04

$$DS^2 = (N - 2) S_{y/x}^2 - (N - 3) S_{y/x(2^o)}^2$$

$$DS^2 = 1,22E+10$$

$$VT = DS^2 / S_{y/x(2^o)}^2$$

$$VT = 3,02$$

$$F_{(1,6)95\%} = 5,99$$

Como $VT < F$, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

- **Teste de Mandel para o Etilbenzeno**

Tabela IV.5 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (Etilbenzeno)

Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
0,11	606142	601432	604520
0,13	684664	716189	718521
0,26	1428017	1394293	1393151
0,34	1836806	1811587	1809152
0,45	2390844	2385368	2382203
0,52	2715235	2750501	2747505
0,75	3892535	3950224	3951245
0,82	4370707	4315357	4318656

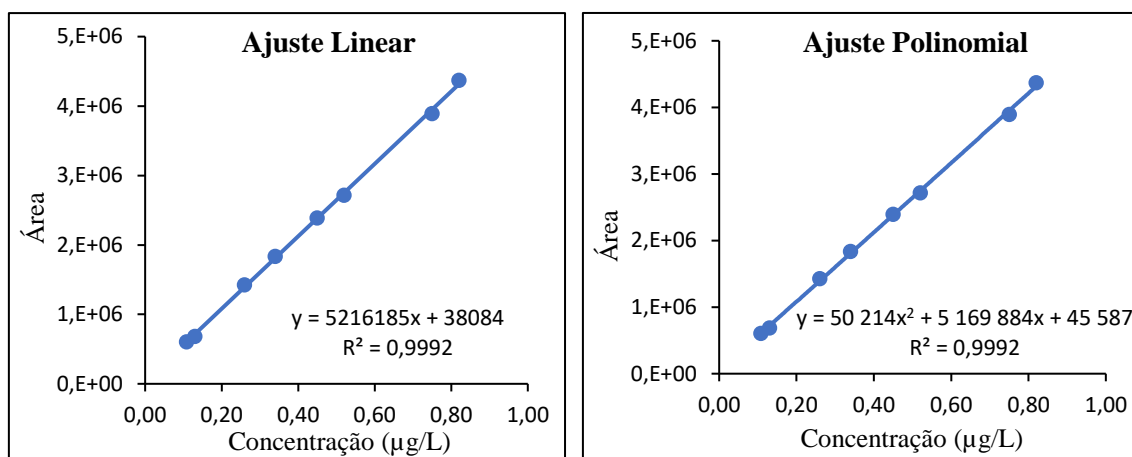


Figura IV.5 e IV.6 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (Etilbenzeno)

Tabela IV.6 – Erros quadráticos para os dois ajustes (Etilbenzeno)

$(y-y_i)^2$	$(y-y_i)^2$
2,22E+07	2,63E+06
9,94E+08	1,15E+09
1,14E+09	1,22E+09
6,36E+08	7,65E+08
2,99E+07	7,47E+07
1,24E+09	1,04E+09
3,33E+09	3,45E+09
3,06E+09	2,71E+09
Soma = 1,05E+10	Soma = 1,04E+10
N-2 = 6	N-3 = 5
$S_{y/x} = 4,17E+04$	$S_{y/x(2^o)} = 4,56E+04$

$$DS^2 = (N - 2) S_{y/x}^2 - (N - 3) S_{y/x(2^o)}^2$$

$$DS^2 = 5,31E+07$$

$$VT = DS^2 / S_{y/x(2^o)}^2$$

$$VT = 0,026$$

$$F_{(1,5)95\%} = 6,61$$

Como $VT < F$, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

- **Teste de Mandel para o m-,p-xileno**

Tabela IV.7 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (m-,p-xileno)

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
0,20	1213376	1248988	1241605
0,24	1385723	1459368	1453368
0,48	2796396	2721645	2722492
0,64	3638429	3563164	3567186
0,84	4680982	4615062	4621492
0,96	5227305	5246200	5253243
1,40	7386128	7560376	7564320
1,52	8237890	8191515	8193157
1,92	10335399	10295310	10284768

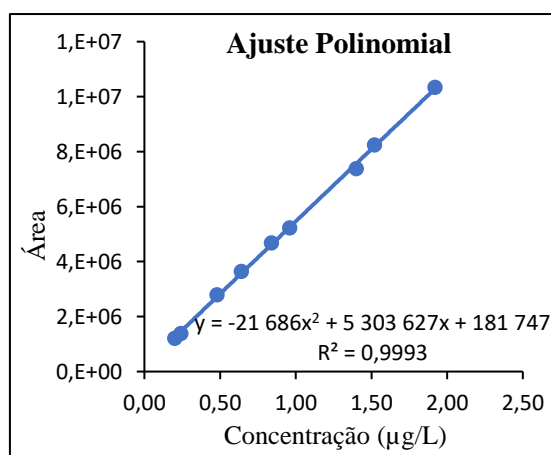
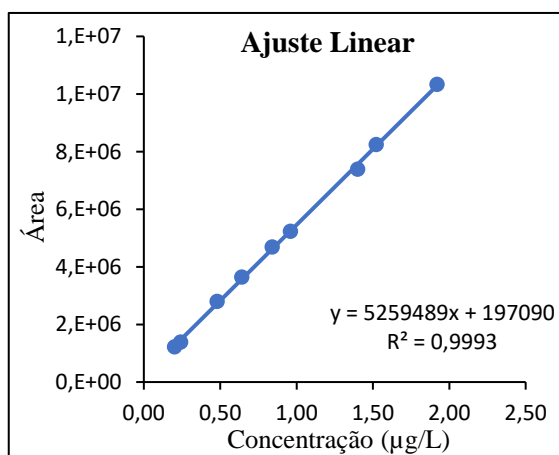


Figura IV.7 e IV.8 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (m-,p-xileno)

Tabela IV.8 – Erros quadráticos para os dois ajustes (m-,p-xileno)

$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$	
	1,27E+09		7,97E+08
	5,42E+09		4,58E+09
	5,59E+09		5,46E+09
	5,67E+09		5,08E+09
	4,35E+09		3,54E+09
	3,57E+08		6,73E+08
	3,04E+10		3,18E+10
	2,15E+09		2,00E+09
	1,61E+09		2,56E+09
Soma =	5,68E+10	Soma =	5,64E+10
N-2 =	7	N-3 =	6
$S_{y/x} =$	9,01E+04	$S_{y/x(2^o)} =$	9,70E+04

$$DS^2 = (N - 2) S^2_{y/x} - (N - 3) S^2_{y/x(2^\circ)}$$

$$DS^2 = 3,28E+08$$

$$VT = DS^2 / S^2_{y/x(2^\circ)}$$

$$VT = 0,035$$

$$F_{(1,6)95\%} = 5,99$$

Como $VT < F$, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

- **Teste de Mandel para o o-xileno**

Tabela IV.9 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (o-xileno)

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
0,20	964008	955899	950497
0,24	1091434	1123191	1118964
0,37	1598155	1666891	1665984
0,49	2269409	2168768	2170247
0,65	2909081	2837938	2841584
0,73	3090185	3172522	3176819
0,86	3744262	3716223	3720958
0,98	4221377	4218100	4222563
1,43	5994774	6100139	6097779
1,55	6679001	6602016	6596290

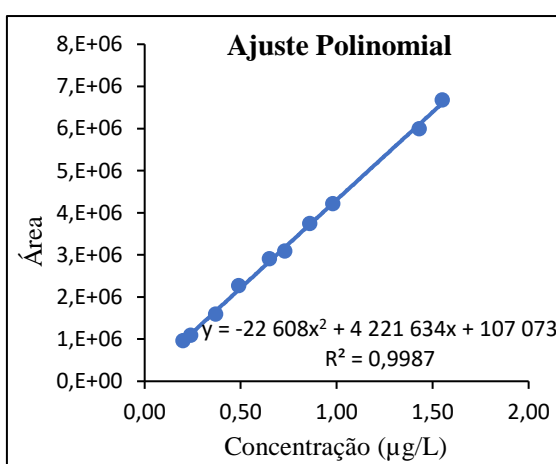
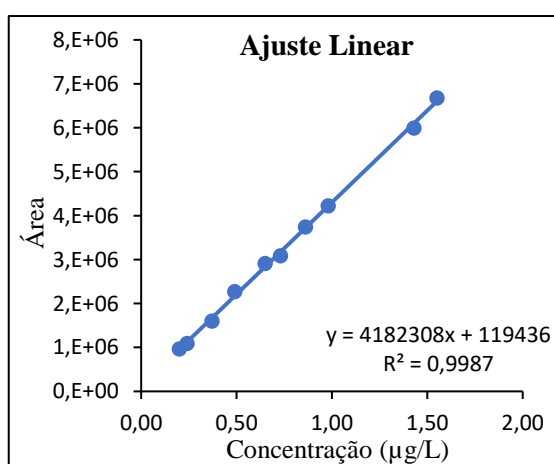


Figura IV.9 e IV.10 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (o-xileno)

Tabela IV.10 – Erros quadráticos para os dois ajustes (o-xileno)

	$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$
	6,58E+07		1,83E+08
	1,01E+09		7,58E+08
	4,73E+09		4,60E+09
	1,01E+10		9,83E+09
	5,06E+09		4,56E+09
	6,78E+09		7,51E+09
	7,86E+08		5,43E+08
	1,07E+07		1,41E+06
	1,11E+10		1,06E+10
	5,93E+09		6,84E+09
Soma =	4,56E+10	Soma =	4,54E+10
N-2 =	8	N-3 =	7
$S_{y/x} =$	7,55E+04	$S_{y/x(2^\circ)} =$	8,06E+04

$$DS^2 = (N - 2) S_{y/x}^2 - (N - 3) S_{y/x(2^\circ)}^2$$

$$DS^2 = 1,63E+08$$

$$VT = DS^2 / S_{y/x(2^\circ)}^2$$

$$VT = 0,025$$

$$F_{(1,7)95\%} = 5,59$$

Como $VT < F$, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

Anexo V – Teste de Rikilt

O teste de Rikilt permite a análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração, ou seja, vai possibilitar concluir acerca do modo de quantificação a utilizar apresentando importante relevância para as análises efetuadas no dia-a-dia por uma instituição laboratorial.

Na realização de procedimentos analíticos em rotina, é necessário que sejam acompanhados inicialmente de calibração, de forma a conseguir quantificar os analitos presentes na amostra. Através do teste de Rikilt verifica-se a possibilidade de realizar a quantificação a partir do fator de resposta, para além do modo de quantificar com recurso à reta de calibração (pode ser efetuada diariamente ou mensalmente, dependendo da validade). O fator de resposta é determinado através de quatro a cinco injeções do padrão da gama mais baixa pela seguinte equação:

$$F_r = \frac{\text{área de pico do padrão}}{\text{concentração do padrão}} \quad (\text{Equação V. 1})$$

Deste modo, vai ser possível aplicar na determinação da concentração de analito na amostra:

$$[\text{analito}] = \frac{\text{área de pico da amostra}}{F_r} \quad (\text{Equação V. 2})$$

Para se poder optar pelo modo de quantificação a realizar, é necessário que a gama de linearidade cumpra os requisitos do teste de Rikilt, que funcionam principalmente na avaliação de dispersão de cada ponto da reta de calibração em relação aos pontos de referência considerados ideais.

Como tal, para a avaliação deste teste calcula-se as razões área/concentração da gama da linearidade assim como a sua média. Logo após, determinam-se as percentagens de cada uma das razões em função da média calculada. Para cumprirem os requisitos do teste de Rikilt, os valores apresentados devem estar compreendidos entre 90% a 110%.

De referir, que em análises realizadas com recurso ao SPME é utilizado com maior frequência o método do fator de resposta, devido à variabilidade associada a esta técnica dificultando o uso da reta de calibração [62].

As Figuras V.1 a V.5, apresentam a aplicação deste teste a cada um dos compostos estudados.

- **Teste de Rikilt para o Benzeno**

Tabela V.1 – Cálculo das razões para o Teste de Rikilt (Benzeno)

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i	Limite Superior	Limite Inferior
0,29	203070	700241	115	110	90
0,52	339731	653329	107	110	90
0,93	590241	634667	104	110	90
1,22	723642	593149	97	110	90
1,39	825782	594088	97	110	90
1,63	927961	569301	93	110	90
1,86	1063838	571956	94	110	90
2,21	1270355	574821	94	110	90
Média		611444			

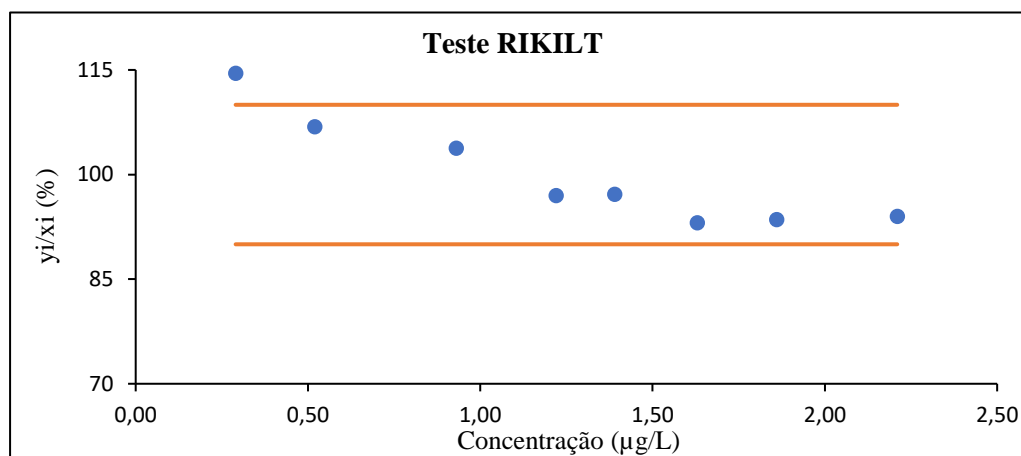


Figura V.1 – Representação gráfica do Teste de Rikilt para o Benzeno

- **Teste de Rikilt para o Tolueno**

Tabela V.2 – Cálculo das razões para o Teste de Rikilt (Tolueno)

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i	Limite Superior	Limite Inferior
0,29	1120974	3865428	109	110	90
0,35	1349755	3856443	109	110	90
0,69	2561687	3712590	105	110	90
1,04	3624728	3485315	98	110	90
1,21	4110372	3397002	96	110	90
1,38	4803439	3480753	98	110	90
1,61	5562168	3454763	97	110	90
2,01	6711502	3339056	94	110	90
2,42	8039893	3322270	94	110	90
Média		3545958			

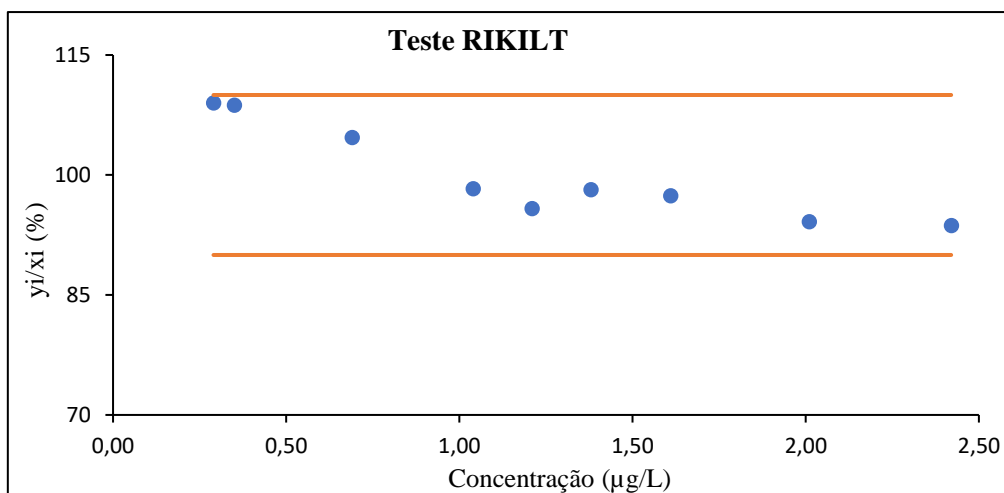


Figura V.2 – Representação gráfica do Teste de Rikilt para o Tolueno

- **Teste de Rikilt para o Etilbenzeno**

Tabela V. 3 – Cálculo das razões para o Teste de Rikilt (Etilbenzeno)

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i	Limite Superior	Limite Inferior
0,11	606142	5612426	105	110	90
0,13	684664	5266646	98	110	90
0,26	1428017	5492373	103	110	90
0,34	1836806	5402371	101	110	90
0,45	2390844	5312987	99	110	90
0,52	2715235	5221606	98	110	90
0,75	3892535	5190047	97	110	90
0,82	4370707	5330131	100	110	90
Média		5353573			

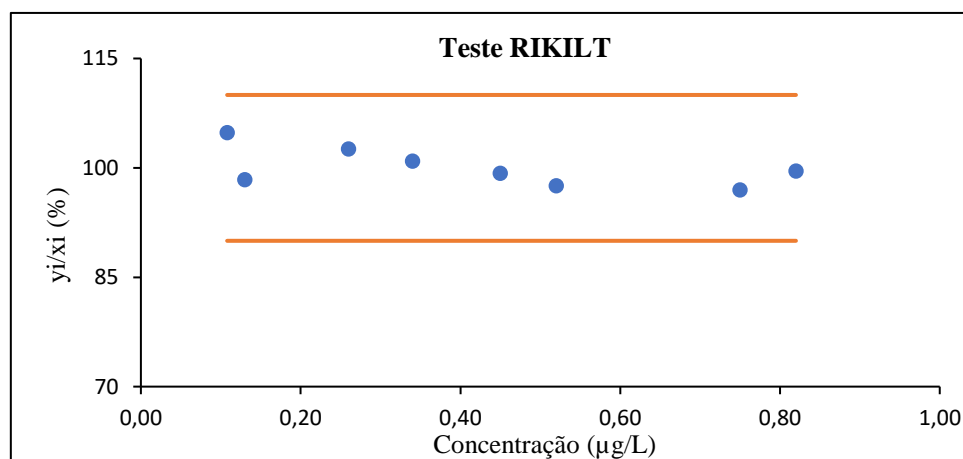


Figura V.3 – Representação gráfica do Teste de Rikilt para o Etilbenzeno

- **Teste de Rikilt para o m-,p-xileno**

Tabela V.4 – Cálculo das razões para o Teste de Rikilt (m-,p-xileno)

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i	Limite Superior	Limite Inferior
0,20	1213376	6066880	108	110	90
0,24	1385723	5773846	103	110	90
0,48	2796396	5825825	104	110	90
0,64	3638429	5685045	101	110	90
0,84	4680982	5572598	99	110	90
0,96	5227305	5445109	97	110	90
1,40	7386128	5275806	94	110	90
1,52	8237890	5419665	97	110	90
1,92	10335399	5383020	96	110	90
Média		5605310			

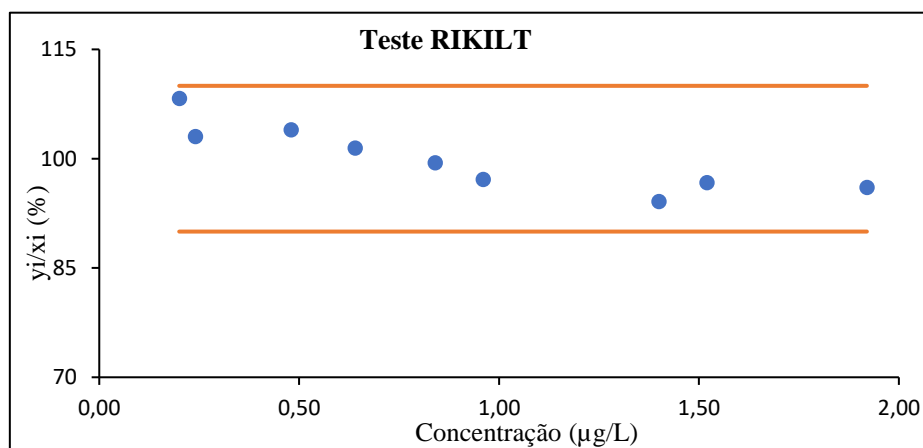


Figura V.4 – Representação gráfica do Teste de Rikilt para o m-,p-xileno

• **Teste de Rikilt para o o-xileno**

Tabela V.5 – Cálculo das razões para o Teste de Rikilt (o-xileno)

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i	Limite Superior	Limite Inferior
0,20	964008	4820040	109	110	90
0,24	1091434	4547642	103	110	90
0,37	1598155	4319338	97	110	90
0,49	2269409	4631447	105	110	90
0,65	2909081	4475509	101	110	90
0,73	3090185	4233130	96	110	90
0,86	3744262	4353793	98	110	90
0,98	4221377	4307528	97	110	90
1,43	5994774	4192150	95	110	90
1,55	6679001	4309033	97	110	90
Média		4431175			

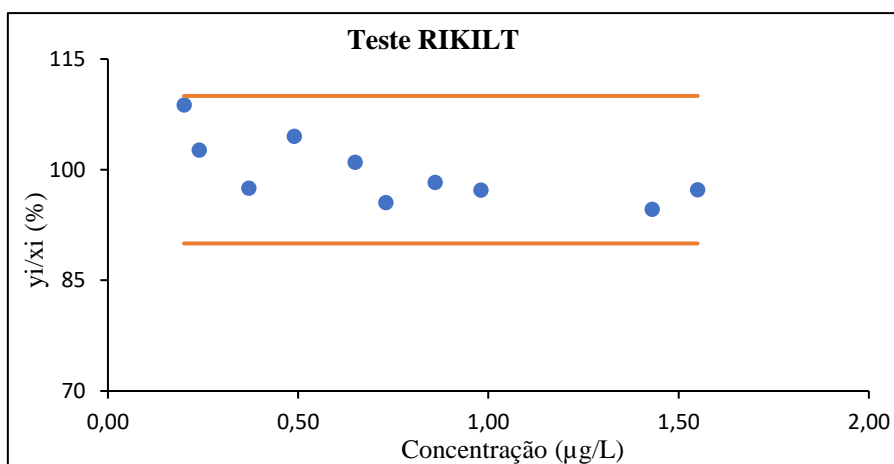


Figura V.5 – Representação gráfica do Teste de Rikilt para o o-xileno

Anexo VI – Teste das Áreas Normalizadas

O teste das áreas normalizadas é utilizado para tirar conclusões relativamente ao método que pode ser utilizado na quantificação de analitos presentes numa amostra, tal como acontece com o teste de Rikilt.

Através da equação da reta obtida pela regressão linear, são estimadas as áreas dos picos obtidas correspondentes às concentrações usadas. Para cada concentração usada, calcula-se a razão entre a área do pico obtido experimentalmente e a área do pico estimada. De seguida, determina-se a concentração para qual a razão é mais próxima de 1, ou seja, que apresenta uma melhor correlação, sendo essa concentração denominada por C_{100} , considerada o valor de referência. Aplica-se então pela seguinte expressão a área normalizada para cada concentração:

$$\text{Área Normalizada} = \frac{A_{100}C_i}{C_{100}A_i} \times 100 \quad (\text{Equação VI. 1})$$

Em que A_{100} é a área do pico correspondente à melhor correlação, A_i e C_i correspondem à área e à concentração de um dado pico, respetivamente.

Para admitir a quantificação dos analitos por fator de resposta as áreas normalizadas devem apresentar valores compreendidos entre 85% e 115%. Nas Figuras VI.1 a VI.5 estão as representações gráficas deste teste para cada um dos compostos estudados [63].

- **Teste das Áreas Normalizadas para o Benzeno**

Tabela VI.1 – Cálculo dos valores normalizados para o Benzeno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Valores Normalizados
215591	0,942	0,29	84,7
341150	0,996	0,52	90,8
564974	1,045	0,93	93,5
723288	1,000	1,22	100,0
816093	1,012	1,39	99,8
947112	0,980	1,63	104,2
1072672	0,992	1,86	103,7
1263741	1,005	2,21	103,2

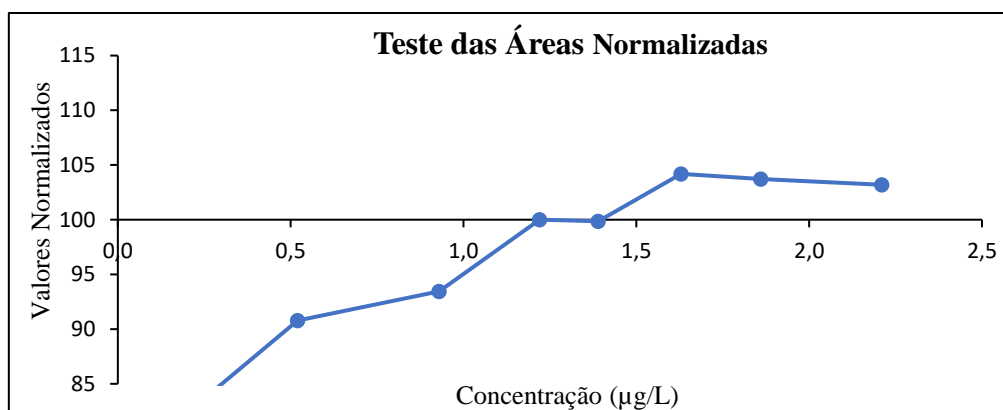


Figura VI.1 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (Benzeno)

- **Teste das Áreas Normalizadas para o Tolueno**

Tabela VI.2 – Cálculo dos valores normalizados para o Tolueno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Valores Normalizados
1188502	0,943	0,29	90,2
1382934	0,976	0,35	90,4
2484712	1,031	0,69	93,9
3618895	1,002	1,04	100,0
4169785	0,986	1,21	102,6
4720674	1,018	1,38	100,1
5465994	1,018	1,61	100,9
6762204	0,993	2,01	104,4
8090819	0,994	2,42	104,9

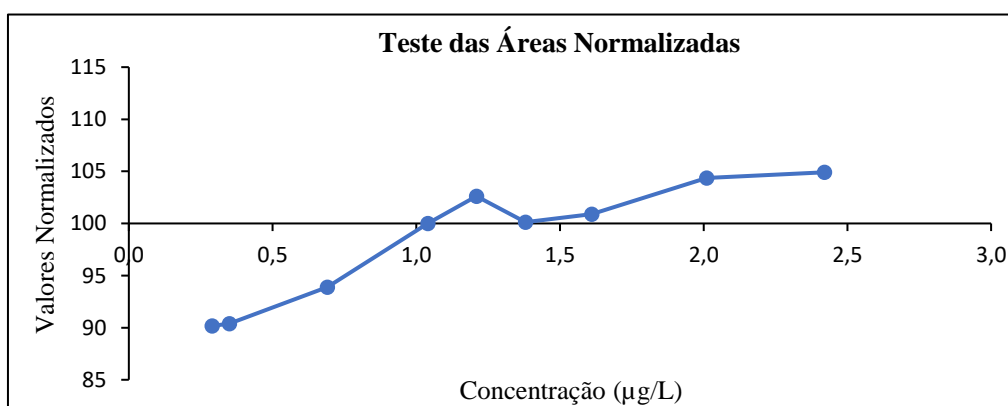


Figura VI.2 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (Tolueno)

- **Teste das Áreas Normalizadas para Etilbenzeno**

Tabela VI.3 – Cálculo dos valores normalizados para o Etilbenzeno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Valores Normalizados
601432	1,008	0,11	94,7
716189	0,956	0,13	100,9
1394293	1,024	0,26	96,7
1811588	1,014	0,34	98,3
2385368	1,002	0,45	100,0
2750501	0,987	0,52	101,8
3950224	0,985	0,75	102,4
4315357	1,013	0,82	99,7

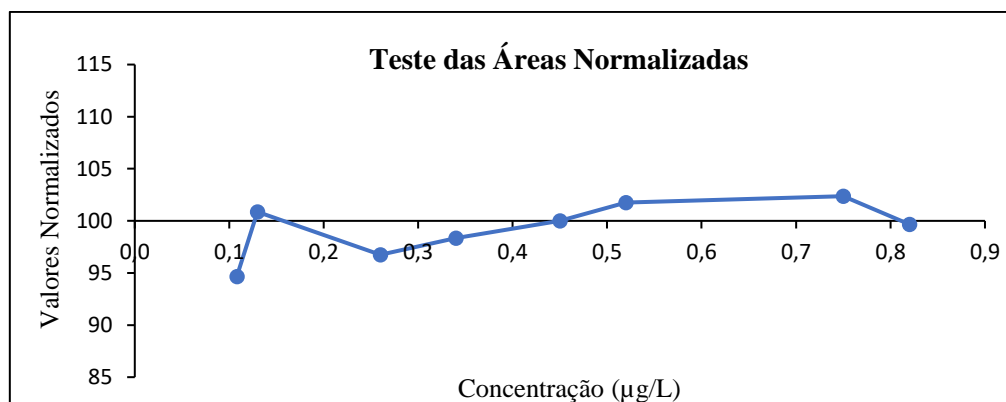


Figura VI.3 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (Etilbenzeno)

- **Teste das Áreas Normalizadas para m-,p-xileno**

Tabela VI.4 – Cálculo dos valores normalizados para o m-,p-xileno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Valores Normalizados
1248988	0,971	0,20	89,8
1459368	0,950	0,24	94,3
2721645	1,027	0,48	93,5
3563164	1,021	0,64	95,8
4615062	1,014	0,84	97,7
5246200	0,996	0,96	100,0
7560376	0,977	1,40	103,2
8191515	1,006	1,52	100,5
10295311	1,004	1,92	101,2

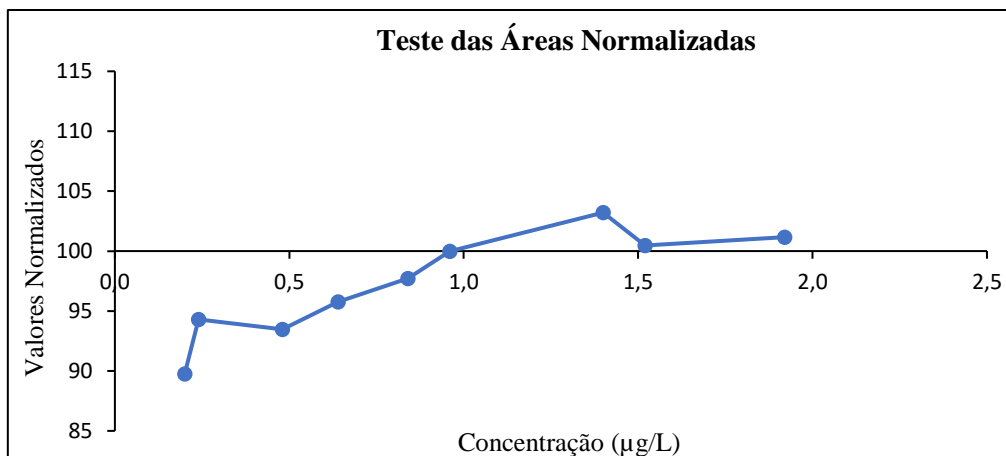


Figura VI.4 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (m,p-xileno)

- **Teste das Áreas Normalizadas para o-xileno**

Tabela VI.5 – Cálculo dos valores normalizados para o o-xileno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Valores Normalizados
955899	1,008	0,20	89,4
1123191	0,972	0,24	94,7
1666891	0,959	0,37	99,7
2168768	1,046	0,49	93,0
2837938	1,025	0,65	96,2
3172522	0,974	0,73	101,8
3716223	1,008	0,86	98,9
4218100	1,001	0,98	100,0
6100139	0,983	1,43	102,8
6602016	1,012	1,55	100,0

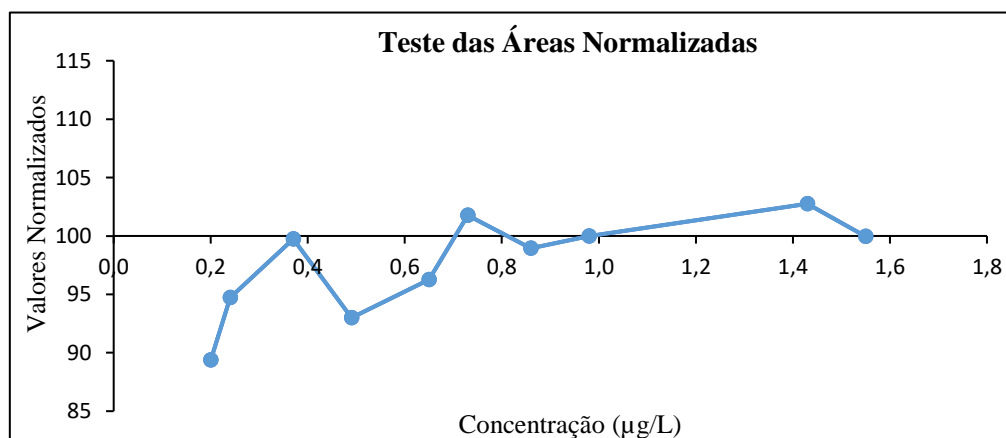


Figura VI.5 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (o-xileno)

Anexo VII – Teste de Homogeneidade de Variâncias

Pelo teste de homogeneidade de variâncias pode-se avaliar a gama de trabalho, ao nível da adequabilidade da mesma. Para a execução do teste, de acordo com a norma ISO 8466-1 recomenda-se o uso de retas com dez pontos de calibração, não devendo ser em número inferior a cinco, distribuindo-se ao longo da gama de concentrações em estudo de modo equitativo. De seguida, são utilizados o padrão de gama inferior e o padrão de gama superior, onde são analisados em dez réplicas independentes cada.

Desta forma, o teste permite avaliar se a gama de trabalho está bem ajustada, analisando a variância dos padrões que delimitam a reta de calibração. A variância de cada padrão é determinada do seguinte modo:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^i (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (\text{Equação VII. 1})$$

Onde i corresponde ao número do padrão e j o número de repetições efetuado para cada padrão. As variâncias são testadas com recurso ao cálculo do valor de teste (PG) que contempla duas situações diferentes, demonstrado pelas seguintes equações:

$$PG = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad \text{se } S_2^2 > S_1^2 \quad (\text{Equação VII. 2})$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{se } S_1^2 > S_2^2 \quad (\text{Equação VII. 3})$$

Se $PG > F_{\text{critico}}$ (valor tabelado da distribuição de Fisher de acordo com o número de graus de liberdade e neste caso para um nível de significância de 99%), as diferenças de variâncias são significativas (não existe homogeneidade). Se $PG < F_{\text{critico}}$ as variâncias são homogêneas e a gama de trabalho está bem ajustada [51].

• **Teste de Homogeneidade de Variâncias para o Benzeno**

Tabela VII.1 e VII.2 – Áreas obtidas para as duas gamas de concentração (Benzeno)

Concentração inferior: 0,29 µg/L

Concentração superior: 2,21 µg/L

Área
169829
159302
155918
147301
152470
131366
139457
143837
159869
145291

Área
798902
875798
917376
941522
983311
979114
934879
1030795
1051969
1047370

N-1 =	9
Média =	150464
Desvio Padrão =	11264,04
RSD =	7,49 (%)
Variância =	1,2688E+08

N-1 =	9
Média =	956103
Desvio Padrão =	80064,23
RSD =	8,37 (%)
Variância =	6,4103E+09

VALOR TESTE (PG) = s_1^2 / s_2^2 se $s_1^2 > s_2^2$ ou $PG = s_2^2 / s_1^2$ se $s_2^2 > s_1^2$

F_{99%} = 5,35

PG = 50,52

Conclusão

Uma vez que PG é superior ao F, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (0,29 a 2,21 µg/L).

• **Teste de Homogeneidade de Variâncias para o Tolueno**

Tabela VII.3 e VII.4 – Áreas obtidas para as duas gamas de concentração (Tolueno)

Concentração inferior: 0,29 µg/L

Concentração superior: 2,42 µg/L

Área
761730
718653
645919
655777
591577
582225
618353
670400
745586
671376

Área
6483274
6712829
7047931
7061653
6479972
7170113
6909116
6684637
7029311
6388373

N-1 =	9
Média =	666160
Desvio Padrão =	61149,67
RSD =	9,18 (%)
Variância =	3,74E+09

N-1 =	9
Média =	6796721
Desvio Padrão =	283700,84
RSD =	4,17 (%)
Variância =	8,05E+10

VALOR TESTE (PG) = s_1^2 / s_2^2 se $s_1^2 > s_2^2$ ou $PG = s_2^2 / s_1^2$ se $s_2^2 > s_1^2$

F_{99%} = 5,35

PG = 21,52

Conclusão

Uma vez que PG é superior ao F, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (0,29 a 2,42 µg/L).

• **Teste de Homogeneidade de Variâncias para o Etilbenzeno**

Tabela VII.5 e VII.6 – Áreas obtidas para as duas gamas de concentração (Etilbenzeno)

Concentração inferior: 0,11 µg/L

Concentração superior: 0,82 µg/L

Área
273131
257064
215209
224350
211291
172584
187663
213517
257016
203462

Área
2477786
2306856
3148830
3475462
3895782
3519770
3497230
3211188
3472553
3397821

N-1 =	9
Média =	221529
Desvio Padrão =	32094,78
RSD =	14,49 (%)
Variância =	1,03E+09

N-1 =	9
Média =	3240328
Desvio Padrão =	491006,70
RSD =	15,15 (%)
Variância =	2,41E+11

VALOR TESTE (PG) = s_1^2 / s_2^2 se $s_1^2 > s_2^2$ ou PG = s_2^2 / s_1^2 se $s_2^2 > s_1^2$

F_{99%} = 5,35

PG = 234,05

Conclusão

Uma vez que PG é superior ao F, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (0,11 a 0,82 µg/L).

• **Teste de Homogeneidade de Variâncias para o m-,p-xileno**

Tabela VII.7 e VII.8 – Áreas obtidas para as duas gamas de concentração (m-,p-xileno)

Concentração inferior: 0,20 µg/L

Concentração superior: 1,92 µg/L

Área
424638
495895
412542
443920
401362
343886
387856
430826
518686
410039

Área
7162258
8453009
7628109
7474008
7039874
7265277
7534680
5541939
5412034
6424866

N-1 =	9
Média =	426965
Desvio Padrão =	50611,31
RSD =	11,85 (%)
Variância =	1,03E+09

N-1 =	9
Média =	6993605
Desvio Padrão =	948247,50
RSD =	13,56 (%)
Variância =	8,99E+11

VALOR TESTE (PG) = s_1^2 / s_2^2 se $s_1^2 > s_2^2$ ou PG = s_2^2 / s_1^2 se $s_2^2 > s_1^2$

F_{99%} = 5,35

PG = 351,03

Conclusão

Uma vez que PG é superior ao F, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (0,20 a 1,92 µg/L).

• **Teste de Homogeneidade de Variâncias para o o-xileno**

Tabela VII.9 e VII.10 – Áreas obtidas para as duas gamas de concentração (o-xileno)

Concentração inferior: 0,20 µg/L

Concentração superior: 1,55 µg/L

Área
411180
386982
317999
346918
307644
273152
310351
334411
395170
322886

Área
3982099
3620116
4997206
5441321
6072996
5375482
5459468
4999108
5343425
5236629

N-1 =	9
Média =	340669
Desvio Padrão =	44176,17
RSD =	12,97 (%)
Variância =	1,95E+09

N-1 =	9
Média =	5052785
Desvio Padrão =	729113,9
RSD =	14,43 (%)
Variância =	5,32E+11

VALOR TESTE (PG) = s_1^2 / s_2^2 se $s_1^2 > s_2^2$ ou PG = s_2^2 / s_1^2 se $s_2^2 > s_1^2$

F_{99%} = 5,35

PG = 272,40

Conclusão

Uma vez que PG é superior ao F, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (0,20 a 1,55 µg/L).

Anexo VIII – Limiares Analíticos (LOD e LOQ)

Para a determinação dos limites de detecção e quantificação, os procedimentos realizados foram efetuados de acordo com o descrito no subcapítulo 5.2.2.

O cálculo dos limites através do desvio padrão residual da reta de calibração, com aplicação das Equações 5.3 e 5.6 não vai estar adicionado neste anexo, pois já se procedeu à realização dos cálculos aquando do estudo de linearidade, pelo método dos mínimos quadrados.

Realçar que neste anexo, por esse motivo, são apenas explicitados os cálculos referentes ao modo de determinação com base na repetibilidade. O método de quantificação foi realizado pelo fator de resposta, com base nas equações e metodologia referida no Anexo V. Na determinação dos limiares analíticos pela repetibilidade injetou-se 10 vezes o padrão correspondente à concentração mais baixa da gama de linearidade e o respetivo desvio padrão. A partir desse momento calculou-se o limite de detecção pela Equação 5.3 e o limite de quantificação pela Equação 5.6.

- **Limite de detecção e quantificação para o Benzeno e Tolueno**

Tabela VIII.1 – Resultado obtido do LOD e LOQ para a gama baixa: 0,29 (µg/L) (Benzeno e Tolueno)

Benzeno			Tolueno	
	Área	Conc. Prática (µg/L)	Área	Conc. Prática (µg/L)
GB1	169829	0,26	761730	0,26
GB2	159302	0,25	718653	0,25
GB3	155918	0,24	645919	0,22
GB4	147301	0,23	655777	0,22
GB5	152470	0,24	591577	0,20
GB6	131266	0,20	582225	0,20
GB7	139457	0,22	618353	0,21
GB8	143837	0,22	670400	0,23
GB9	159869	0,25	745586	0,25
GB10	145291	0,22	671376	0,23
Média	150454	0,23	666160	0,23
Sx0		0,017		0,021
RSD (%)		7,50		9,18
LOD (µg/L)		0,058		0,070
LOQ (µg/L)		0,17		0,21

- **Limite de detecção e quantificação para o Etilbenzeno**

Tabela VIII.2 – Resultado obtido do LOD e LOQ para a gama baixa: 0,11 (µg/L) (Etilbenzeno)

Etilbenzeno		
	Área	Conc. Prática (µg/L)
GB1	273131	0,09
GB2	257064	0,08
GB3	215209	0,07
GB4	224350	0,07
GB5	211291	0,07
GB6	182584	0,06
GB7	207663	0,07
GB8	213517	0,07
GB9	257016	0,08
GB10	203462	0,07
Média	224529	0,07
Sx0		0,0094
RSD (%)		12,73
LOD (µg/L)		0,031
LOQ (µg/L)		0,09

- **Limite de detecção e quantificação para o m-,p-xileno e o-xileno**

Tabela VIII. 3 – Resultado obtido do LOD e LOQ para a gama baixa: 0,20 (µg/L) (m-,p-xileno e o-xileno)

m-,p-xileno			o-xileno	
	Área	Conc. Prática (µg/L)	Área	Conc. Prática (µg/L)
GB1	424638	0,13	411180	0,16
GB2	495895	0,15	386982	0,15
GB3	412542	0,13	317999	0,12
GB4	443920	0,14	346918	0,14
GB5	401362	0,12	307644	0,12
GB6	343886	0,11	273152	0,11
GB7	387856	0,12	310351	0,12
GB8	430826	0,13	334411	0,13
GB9	518686	0,16	395170	0,15
GB10	410039	0,13	322886	0,13
Média	426965	0,13	340669	0,13
Sx0		0,016		0,017
RSD (%)		11,85		12,97
LOD (µg/L)		0,052		0,058
LOQ (µg/L)		0,16		0,17

Anexo IX – Estimativa das incertezas do Método

A incerteza de um método, usualmente, é determinada por três metodologias diferentes. Porém os laboratórios podem decidir qual a melhor metodologia a seguir desde que provem que são tecnicamente válidas e aplicáveis no método em estudo.

A primeira abordagem utilizada na determinação das incertezas é a metodologia “passo a passo” onde foram consideradas e quantificadas as seguintes fontes de incerteza:

- **Incerteza associada à preparação dos padrões**

O cálculo desta incerteza está associado desde início às fontes primárias de incerteza, como a pesagem do padrão comercial, à medição do volume (balão volumétrico), pureza do padrão e soluções intermédias necessárias para preparar os padrões. A soma destes fatores vai permitir determinar a incerteza associada à preparação dos padrões. Neste estudo, no entanto, não existiu pesagem dos padrões comerciais pois os compostos encontravam-se em estado líquido.

- **Incerteza associada à interpolação da curva de calibração**

A incerteza associada à interpolação da curva de calibração, desde que cumpra as normas ISO referentes à linearidade pelo método de mínimos quadrados, vai ser calculada a partir da seguinte equação:

$$u_{reta} = \frac{S_{y/x}}{m} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_b - \bar{y})^2}{m^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação IX. 1})$$

No qual o desvio padrão residual, $S_{y/x}$, é dado por:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - mx_i - b)^2}{N - 2}} \quad (\text{Equação IX. 2})$$

- **Incerteza associada à precisão intermédia (padrão de controlo)**

A precisão é uma componente bastante importante na incerteza global pelo que precisa de ser avaliada, tendo em conta a variabilidade, dispersão e erros aleatórios que possam existir ao longo da aplicação do método analítico.

Desta forma, pode-se optar entre a precisão intermédia e a repetibilidade para avaliação da incerteza. Neste estudo, foi escolhida a precisão intermédia derivado do facto de conseguir refletir eventuais variações do método que possam ocorrer quando são em dias diferentes.

Foi calculada a incerteza da precisão intermédia com recurso aos padrões de controlo, dada pela seguinte fórmula:

$$u_{prec\ interm} = \frac{S}{\bar{C} \times \sqrt{N}} \times 100 \quad (\text{Equação IX. 3})$$

Em que S é o desvio padrão associado à média dos ensaios efetuados e \bar{C} a concentração média do número de padrões analisados, N.

- **Incerteza combinada**

Com base nas três incertezas associadas à primeira metodologia é possível calcular a incerteza combinada, através da seguinte equação:

$$u_c(U) = \sqrt{(u_{padr\tilde{a}o}^2 + u_{reta}^2 + u_{prec\ interm}^2)} \quad (\text{Equação IX. 4})$$

As outras duas metodologias baseiam-se na aplicação de parâmetros do desempenho global do método, para conseguir quantificar de uma forma abrangente a incerteza associada ao ensaio. Estas metodologias consistem na incerteza combinada relativa à incerteza associada à precisão e a incerteza associada à exatidão, em que se usou dados relativos aos ensaios de recuperação.

- **Incerteza associada à precisão**

A incerteza associada à precisão nesta metodologia é baseada na variabilidade do método analítico, como tal a equação utilizada foi a seguinte:

$$u_{prec\ interm} = \frac{S}{\bar{C} \times \sqrt{N}} \times 100 \quad (\text{Equação IX. 5})$$

Em que S é o desvio padrão associado à média dos ensaios efetuados e \bar{C} a concentração média do número de padrões analisados, N.

- **Incerteza associada à exatidão**

Com a ausência de MRC e ensaios interlaboratoriais fatores utilizados para calcular a incerteza associada à exatidão, aplicou-se duas formas de estimar o coeficiente de incerteza: a indicada na norma ISO 11352, e também no Guia Nordtest e a indicada pelo VAM (*Valid Analytical Measurement*) e também pelo OGC007 emitido pelo IPAC.

De acordo com a ISO 11352 e o Guia Nordtest, a incerteza associada à exatidão pode ser calculada a partir do *bias*. O *bias* consiste em duas componentes: a diferença entre uma recuperação a 100% e da observada experimentalmente e ainda da incerteza associada à concentração adicionada à amostra.

O *bias* pode ser calculado da seguinte forma:

$$u_{bias} = \sqrt{b_{R_m}^2 + u_{fort.}^2} \quad (\text{Equação IX. 6})$$

Em que b_{R_m} corresponde à raiz quadrada dos desvios associados aos ensaios de recuperação e $u_{fort.}$ corresponde à incerteza na concentração de analito adicionado.

A raiz quadrada dos desvios associados aos ensaios de recuperação, b_{R_m} , foi obtida pela Equação IX.7:

$$b_{R_m} = \sqrt{\frac{\sum b_i^2}{n}} \quad (\text{Equação IX. 7})$$

No qual b_i é o desvio entre a recuperação de analito a 100% da amostra e a recuperação de analito obtida experimentalmente e n é o número de ensaios de recuperação [64, 65].

De acordo com o VAM e o IPAC, a incerteza associada à exatidão nesta metodologia é baseada na fortificação das várias matrizes com uma concentração conhecida usada nos ensaios de recuperação. Neste contexto, fortificou-se a matriz com uma concentração conhecida (gama baixa) e efetuou-se o mesmo para mais matrizes. O valor médio dos ensaios de recuperação, \bar{R}_m , obtido é demonstrado pela seguinte equação:

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}}{C_{spike}} \quad (\text{Equação IX. 8})$$

Em que \bar{C} corresponde à concentração média obtida nos ensaios de recuperação efetuados e C_{spike} corresponde à concentração teórica da amostra fortificada.

A incerteza associada à exatidão é calculada através da Equação IX.9:

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{S^2}{N \times \bar{C}^2}\right) + \left(\frac{u(C_{spike})}{C_{spike}}\right)^2} \quad (\text{Equação IX. 9})$$

Em que S é o desvio padrão de uma série de análises de amostras fortificadas e $u(C_{\text{spike}})$ corresponde à incerteza associada à fortificação da amostra [66, 67].

- **Incerteza combinada**

Nestas duas metodologias a incerteza expandida foi expressa da seguinte forma, sendo que a única diferença é a variação da incerteza associada à exatidão que varia de acordo com as Equações IX.6 e IX.9 aplicadas:

$$u_c(U) = \sqrt{(u_{\text{precisão}}^2 + u_{\text{exatidão}}^2)} \quad (\text{Equação IX.10})$$

- **Incerteza Expandida**

A incerteza global do método, normalmente é expressa como incerteza expandida (U), uma unidade de medida, dada para uma função de distribuição, geralmente, normal e com um nível de confiança entre os 95% ou 99%. A incerteza expandida é igual à incerteza combinada afetada por um coeficiente de expansão, k , que toma valores situados entre 2 e 3. Neste caso, calculou-se para um k de valor 2 com um nível de confiança de 95%, através da seguinte equação:

$$U(C) = 2 \times u_c(C) \quad (\text{Equação IX.11})$$

A expressão dos resultados com a incerteza é apresentada desta forma:

$$C \pm U(C) [\text{Unidades de concentração}]$$

É recomendado, pela IPAC, que a incerteza seja apresentada com um máximo de dois algarismos significativos e que o número de dígitos do resultado da medição deve ser apresentado em função da incerteza, isto é, do seu número de algarismos significativos. Compete ao laboratório decidir de acordo com as suas regras de arredondamento [52,53].

Anexo X – Análise de Custos

Com o objetivo de completar o trabalho realizado, efetuou-se uma análise de custos deste de modo a ter uma perspectiva dos custos associados ao desenvolvimento de um método de análise.

Realizou-se uma estimativa quanto possível, dos materiais utilizados incluindo padrões comerciais e solventes, bem como equipamentos (exemplo custo de coluna), entre outros, ao longo de todo o trabalho.

Tabela X.1 – Custos associados ao desenvolvimento do método

Material	Marca	Quantidade Utilizada	Preço
Padrões comerciais			
Benzeno	Chem Service	1 Frasco	12,52
Tolueno	Carlo Erba Reagents	2,5L	5,40
Etilbenzeno	Chem Service	1 Frasco	10,45
m-xileno	Chem Service	1 Frasco	10,45
p-xileno	Chem Service	1 Frasco	10,45
o-xileno	Chem Service	1 Frasco	10,45
Solventes			
Metanol	Carlo Erba Reagents	2,5L (2X)	10,80
Fibras			
CAR/PDMS	Supelco	1 Cx	200,00
PDMS 7 µm	Supelco	1 Cx	200,00
PDMS 30 µm	Supelco	1 Cx	200,00
PDMS 100 µm	Supelco	1 Cx	200,00
PA	Supelco	1 Cx	200,00
PDMS/DVB	Supelco	3 Cx	600,00
DVB/CAR/PDMS	Supelco	1 Cx	200,00
Consumíveis			
Capsulas magnéticas	Gerstel	5 Embalagens	366,67
Acessórios			
Coluna	Agilent	1 unidade	1128,20
Suporte de Fibras	Supelco	1 unidade	208,50
Capsulador	Agilent	1 Unidade	212,60
Descapsulador	Agilent	1 Unidade	77,00
Seringas	Agilent	6 Unidades	307,80
Total			4171,29

